ORSAY
Série A, N°
D'ordre :

614

THESE PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

Université de Paris

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

Monique BARAT née GUERIDE

Etude comparative de la recombinaison génétique par transformation et par transduction dans deux régions du chromosome de Bacillus subtilis.

Soutenue le 16 Avril 1970 devant la Commission d'examen.

MM. P. SCHAEFFER Président

C. ANAGNOSTOPOULOS
J.C. MOUNOLOU
} Examinateurs

Ce travail a été effectué au Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette sous la direction de Monsieur ANAGNOSTOPOULOS, Directeur de Recherche au C.N.R.S.

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur le Professeur SLONIMSKI qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.

Que Monsieur ANAGNOSTOPOULOS qui m'a initiée à la recherche, a guidé et suivi activement mon travail, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie Messieurs SCHAEFFER et MOUNOLOU d'avoir accepté de juger ce travail.

Je désire enfin remercier tous mes camarades de laboratoire et toutes les personnes qui se sont associées à la réalisation pratique de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES 5

1. Nomenclature 5
2. Souches bactériennes 5
3. Milieux 5
4. Préparation de l'ADN 6
   1) ADN bactérien 6
   2) ADN extrait à partir des particules du bactériophage PBS1 7
5. Transformation 7
6. Transduction par le bactériophage SP10 8
7. Transduction par le bactériophage PBS1 8
8. Transduction par le bactériophage 3NT 9
9. Irradiation par les rayons U.V. 9
   1) Bactéries 9
   2) Bactériophage SP01 9
10. Sensibilité à la mitomycine C. 10
11. Mesure de l'incorporation de l'ADN par les cellules compétentes 10
   1) Préparation de l'ADN marqué 10
   2) Incorporation 10
12. Libération de produits radioactifs après irradiation 11
13. Incorporation de thymidine tritiée après irradiation 11

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Page

CHAPITRE II : GROUPES DE LOCI GENETIQUES REGISSANT LA BIOSYNTHESE DE L'ISOLEUCINE DE LA VALINE ET DE LA LEUCINE. 13

Résultats 13

1. Caractéristiques des mutants 13

2. Croisements à deux facteurs en répulsion 14

3. Croisements à deux facteurs en couplage 15

4. Mise en évidence de deux nouveaux groupes de liaison 16

5. Cartes génétiques 16

6. Cas de liaisons faibles 17

Discussion et conclusions 19

CHAPITRE III : ETUDE DE LA TRANSDUCTION PAR PBS1 DANS LES REGIONS argA - nic-38 et lys-1 - ilvA. CONSTRUCTION DE CARTES GENETIQUES PAR TRANSDUCTION 21

Résultats 22

1 - Croisements par transduction à l'aide du phage PBS1 22

1. Cotransfert par PBS1 de marqueurs faiblement liés en transformation 22

2. Fréquence de recombinaison entre marqueurs fortement liés 23

3. Mise en évidence des liaisons entre marqueurs non liés par transformation. 23

4. Croisements à trois facteurs. 25

II - Comparaison des fréquences de recombinaison au cours de la transformation et de la transduction 28

1. Analyse de croisements à trois facteurs dans la région try par les deux méthodes 28

2. Transformation par de l'ADN extrait à partir des particules du phage PBS1 29

Discussion et conclusions. 30

Page

CHAPITRE IV - DIFFERENCE DANS LA RECOMBINAISON ENTRE TRANSFORMATION ET TRANSDUCTION PAR PBS1. PROPRIETES DES MUTANTS DEFECTIFS POUR LA RECOMBINAISON. 35

Résultats 36

1. Transformation et transduction par le bactériophage SP10 des souches portant les marqueurs recA1, recB2 ou uvr1 36

2. Transduction par PBS1 des souches qui portent les mutations recA1, recB2 ou uvr-1 37

3. Propriétés des souches qui portent les marqueurs recB3 et rec-4. 38

a - Sensibilité aux rayons ultraviolets et à la mitomycine C 38

b - Transformation 38

c - Transduction 39

d - Etude des mutations en retour chez les souches recB3 39

e - Localisation du marqueur recB3 40

4. Réactivation par l'hôte des bactériophages irradiés. 41

5. Pénétration de l'ADN dans les souches rec$^+$ et rec. 41

6. Dégradation de l'ADN après irradiation. 42

7. Incorporation de thymidine tritiée après irradiation. 42

Discussion et conclusions. 43

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS 48

RESUME 54

BIBLIOGRAPHIE 56

Les études génétiques chez Bacillus subtilis ont débuté par la découverte en 1958 de la transformation chez cet organisme par SPIZIZEN (1). Il devenait ainsi possible d'effectuer, par la transformation, sur une bactérie du genre Bacillus, des travaux d'analyse génétique de la même ampleur que ceux effectués chez E.coli et S.thyphimurium. En effet, contrairement aux autres organismes utilisés dans la transformation B.subtilis peut croître sur un milieu synthétique composé de sels minéraux et d'une source de carbone. Il est donc possible d'analyser des fonctions impliquées dans la synthèse de la plupart des composés de la cellule ainsi que leur régulation.

Au cours de l'extraction de l'ADN par les méthodes classiques, le génome de B.subtilis est fragmenté en cent à deux cent segments dont la taille varie de 1 à $3 10^7$ daltons. Il est donc évident que la transformation ne peut permettre que l'analyse de régions assez courtes du chromosome. Si la formation de segments d'ADN transformant est provoquée par des cassures au hasard on pourrait s'attendre, dans certains cas, à des chevauchements des cartes génétiques ce qui permettrait d'étendre l'analyse à des régions plus étendues. Certains marqueurs paraitraient alors très faiblement liés.

Au moment où ce travail a débuté une seule région du génome avait fait l'objet d'une étude détaillée par la transformation, celle correspondant au groupe des gènes qui régissent la synthèse du tryptophane (2). Une autre étude avait porté sur l'analyse de mutants qui affectent la biosynthèse de l'histidine. Ces derniers appartiennent à deux classes : deux marqueurs sont liés aux marqueurs tryptophane, cinq autres sont liés entre eux mais situés dans une autre région du génome (20 -50).

Les études sur le "segment tryptophane" n'avaient pas mis en évidence des cas de liaison très faible. D'autre part des différences importantes concernant les valeurs de recombinaison entre certains marqueurs avaient été observées dans les croisements réciproques. Ces faits semblaient en faveur de l'existence d'au moins une cassure préférentielle en ce qui concerne ce segment d'ADN (2). Nous nous sommes demandés si la situation ne serait pas différente dans d'autres régions du chromosome et si de telles études ne pourraient pas permettre d'aborder une analyse génétique moins fragmentaire du génome de B.subtilis. Pour aborder ce travail, nous avons considéré d'autres voies de biosynthèse d'acides aminés dont les gènes chez E.coli et S.tryphimurium, sont groupés sur le chromosome et forment des opérons. Si une situation analogue existait sur le génome de B.subtilis on pourrait alors révéler aisément des segments d'ADN sur lesquels plusieurs loci seraient connus. Il faut signaler ici que la recherche des similitudes ou différences dans l'organisation des gênes chez les Enterobacteriaceae et les Bacillaceae présente également par elle même un intérêt considérable. Parmi les voies qui correspondaient à ces critères étaient celles de la synthèse des acides aminés ramifiés isoleucine et valine. Nous avons donc entrepris une analyse génétique des mutants de B.subtilis exigeant ces composés pour leur croissance. Les résultats de cette analyse ont mis en évidence deux groupes de gènes situés dans des régions différentes du génome, ils sont présentés dans le chapitre II. Nous avons également observé des relations de liaison de ces groupes avec d'autres loci et mis en évidence des cas de liaison faible dans ces deux régions. L'étude de la faible fréquence de cotransfert de certains marqueurs nous a conduit à la comparaison des résultats génétiques obtenus par transformation à ceux qu'on pourrait obtenir par transduction.

Deux systèmes de bactériophage transducteur sont connus chez B.subtilis, SP10 découvert par THORNE (66) et PBS1 découvert par TAKAHASHI (61). Dans le cas du phage SP10 les quelques travaux effectués semblent

indiquer que le nombre de marqueurs cotransférés et les fréquences de recombinaison sont comparables à ceux obtenus par transformation (19). Le phage PBS1 a une taille importante (62). On pouvait donc espérer que les segments transférés par ce phage seraient plus longs que les segments d'ADN transformant de nos préparations.

C'est dans le but de vérifier les relations de liaison suggérées par les faibles cotransferts de certains marqueurs, au cours de la transformation, que nous avons entrepris une étude détaillée de la transduction par PBS1 dans les régions du génome de B.subtilis que nous étions en train d'analyser. Les résultats ont non seulement confirmé ces cas de liaison mais ont permis de mettre en évidence de nouvelles relations de liaison génétique. Il est apparu ainsi qu'effectivement PBS1 transférait des segments du chromosome dépassant de plusieurs fois la longueur moyenne des segments d'ADN transformant. Les cartes de deux régions relativement étendues du chromosome ont été établies. Ces résultats sont présentés dans le chapitre III.

La différence de longueur entre les fragments de chromosome transférés par le phage PBS1 et les segments d'ADN transformant est une raison suffisante pour s'attendre à priori à des valeurs de recombinaison entre marqueurs liés plus faibles au cours de la transduction. Toutefois les différences entre les valeurs de recombinaison observées, spécialement entre celles de marqueurs fortement liés en transformation, semblaient être trop grandes pour qu'on puisse l'attribuer uniquement à la différence de taille des segments. Ceci nous a conduit à envisager la possibilité de différences dans le mécanisme de recombinaison opérant en transformation et transduction par PBS1. Dans le but d'apporter une réponse à cette question nous avons étudié le comportement de certaines souches qui sont plus sensibles aux radiations ultraviolettes que la souche sauvage de B.subtilis et peu transformables. Elles ressemblent donc aux mutants défectifs pour la recombinaison génétique décrits chez d'autres organismes. Ces résultats

sont présentés dans le chapitre IV. Ils montrent qu'effectivement il existe une différence dans le mécanisme de la recombinaison entre la transformation et la transduction par PBS1. Dans le but de préciser les fonctions responsables nous avons effectué des études sur certaines propriétés des souches sensibles aux rayons ultraviolets.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

1 - Nomenclature

Pour la présentation du génotype des souches, nous avons suivi les recommendations de DEMEREC, ADELBERG, CLARK et HARTMAN (15). Lorsque le locus génétique est déterminé l'abréviation correspondant au marqueur est suivie d'une lettre majuscule. Les majuscules sont assignées aux différents loci dans l'ordre des séquences biochimiques.

2 - Souches bactériennes

La souche qui est à l'origine des mutants que nous avons utilisés est la souche 168M.

La souche sauvage de référence est la souche WT obtenue par transformation de la souche 168M par de l'ADN extrait à partir de la souche W23. Ces deux souches 168M et W23 dérivent de la souche B.Subtilis Marburg. Le génotype et l'obtention des différents mutants que nous avons utilisés sont indiqués dans le tableau I.

3 - Milieux

Le milieu minimum est celui de SPIZIZEN (60). Nous avons utilisé, comme milieu riche, le milieu Penassay Broth (PAB - Difco antibiotic medium n°3). Le milieu Tryptose blood agar base (TBAB - Difco) 17,5 g/l additionné

TABLEAU I : Origine et génotype des souches utilisées.

N°	Génotype	Origine
23	ilvA23	J. SPIZIZEN
168M	trpC2	" "
168T⁻	trpC2 thyX1 thyY1	" "
WT[1]	prototrophe	transformation[1]
SB25	trpC2 his-2	E.W. NESTER
SB181	trpC2 aro-2	E.W. NESTER
SMBL4	purB6 leu-8 metB5 recA1[2]	A. RÖRSH
MC1	trpC2 recB2[2]	S. OKUBO
UVR	thyX1 thyY1 uvr-1	B. STRAUSS
GSY 111[3]	ilvA1 trpC2	UV sur 168 M
" 119	trpB3 his-2	transformation[4]
" 120	trpB3 trpC2	"
" 184	ilvC1 trpC2	UV sur 168 M
" 186	leu-2 trpC2	"
" 201	ilvC1 leu-1	transformation
" 225	phe-1 trpC2	ADN WT (HNO2)[5] → GSY 184
" 226	metB2 trpC2	ADN wt (HNO2) → GSY 111
" 227	metB3 trpC2	"
" 228	metB4 trpC2	"
" 229	leu-1 trpC2	transformation
" 230	leu-1 phe-1	"
" 231	ilvC3 trpC2	ADN WT (HNO2) → GSY 225
" 236	ilvD2 metB3	transformation
" 237	ilvD2 metB4	"
" 240	ilvA1 metB3	"
" 241	ilvA2 phe-1	"
" 243	ilvA2 lys-1	"

Tableau I : (suite)

N°	Génotype	Origine
GSY 244	ilvC1 phe-1	transformation
" 248	metB4 trpC2 leu-1	"
" 250	argA2 trpC2	ADN WT (HNO_2) → GSY 254
" 254	lys-1 trpC2	ADN WT (HNO_2) → GSY 225
" 260	ilvD2 trpC2	ADN wt (HNO_2) → GSY 228
" 274	ilvC3 leu-2	transformation
" 275	phe-1 leu-1 trpC2	"
" 276	ilvD4 trpC2	UV sur 168 M
" 277	ilvA2 trpC2	UV sur 168 M
" 279	ilvA1 ilvD2	transformation
" 301	leu-3 trpC2	ADN wt (HNO_2) → GSY 184
" 384	argA2 leu-1	transformation
" 386	metB3 his-2	"
" 388	aro-2 his-2 metB3	"
" 391	aro-2 his-2 lys-1	"
" 393	his-2 lys-1	"
" 398	his-2 trpC2 trpE8	"
" 411	lys-1 rib-2	"
" 417	lys-1 ser-1	"
" 419	trpC2 rib-2	"
" 809	ser-1 trpC2	"
" 816	ilvC1 nic-38 phe-2	"
" 817	ser-1 rib-2	transduction
" 822	recB3(5) trpC2	UV sur 168 M
" 834	rec-4 trpC2	NTG sur 168 M
" 953	ilvC1 nic-38 recB3	transformation
" 954	recB3	"
" 955	ilvC1 recB3	"
" 958	ilvC1 nic-38	"
" 959	ilvC1 phe-2	"
" 960	ilvC1	"
" 961	his-2 trpC2 recB3	"

Tableau I : (suite)

(1) WT Souche prototrophe de référence obtenue par transformation de la souche 168M par de l'ADN W23 (souche 23 prototrophe).

(2) L'appellation recA et recB désigne des loci différents, elle est sans rapport avec l'appellation recA et recB des mutants d'E.coli.

(3) Les souches GSY ont été obtenues dans ce laboratoire.

(4) Souches construites par transformation à partir des mutants portant les marqueurs désirés.

(5) Souches obtenues par transformation à l'aide de l'ADN WT traité à l'acide nitreux. La pointe de la flèche indique la souche réceptrice.

NTG = N méthyl N' nitro-N-nitrosoguanidine.

d'agar (1,5 %) a été employé comme milieu complet solide. Le milieu Difco nutrient broth a été utilisé pour déterminer le titre des suspensions de bactériophages.

4 - Préparation de l'ADN

1) ADN bactérien

En règle générale nous avons utilisé la méthode de MARMUR (46) ; nous avons aussi employé la méthode suivante : les cellules en phase stationnaire sont centrifugées et suspendues dans une solution d'EDTA (éthylène diamine, tétraacétate) 0,1 M et de chlorure de sodium 0,15 M, à pH 8 ($\frac{1}{20}$ du volume de la culture). Après addition de 200 µg/ml de lysozyme elles sont incubées à 37° pendant 2 heures. La lyse est achevée par addition de lauryl sulfate de sodium (concentration finale 0,5 %) et de perchlorate de sodium (concentration finale 1 M). La déprotéinisation est effectuée par plusieurs traitements au chloroforme-octanol. L'ADN est finalement précipité par de l'alcool à 90° et les fibres sont dissoutes dans une solution de citrate de sodium 0,015 M et de chlorure de sodium 0,15 M.

Dans le but d'obtenir des préparations d'un poids moléculaire moyen plus élevé nous avons extrait l'ADN par la méthode suivante : les cellules en phase exponentielle sont centrifugées et remise en suspension dans un milieu qui permet la formation de protoplastes - sucrose 25 %, chlorure de sodium 0,15 M, citrate de sodium 0,015 M, lysozyme 100 µg/ml (les concentrations indiquées sont celles du milieu de la réaction). Lorsque tous les bacilles sont sous forme de protoplastes la lyse est effectuée par addition de lauryl sulfate de sodium 0,2 % (concentration finale). Après incubation pendant deux heures à 37° en présence de pronase (1 mg/ml) un volume égal de phénol redistillé, saturé d'eau et tamponné, est ajouté à la suspension. Le mélange est agité doucement. La solution

d'ADN recueillie après centrifugation est dialysée contre une solution de chlorure de sodium 0,015 M et de citrate de sodium 0,0015 M.

2) ADN extrait à partir des particules du bactériophage PBS1.

L'ADN a été extrait à partir d'un litre de suspension de bactériophages. Un lysat a été obtenu par infection d'une culture de B.Subtilis en phase exponentielle. On élimine les débris bactériens par centrifugation à 8.000 tr/mn. Le surnageant est centrifugé à 17.000 tr/mn dans une centrifugeuse réfrigérée pendant une heure. Le culot est repris dans du milieu PAB ($\frac{1}{50}$ du volume initial) et de nouveau centrifugé à faible vitesse. Trois cycles de centrifugation à forte puis faible vitesse sont ainsi effectués. Le culot final est repris dans 2 ml de tampon Tris (trishydroxyméthylaminométhane TRIZMA SIGMA CHEM; CO) - HCl 0,1 M pH 7,0 et chlorure de sodium 0,1 M. Cette suspension (titre 8.10^{10} u/ml) est incubée pendant une heure à 37° en présence de lysozyme 100 µg/ml, de désoxyribonucléase 10 µg/ml (désoxyribonucléase I cristallisée 1 X, Worthington Biochemical Corporation) et de sulfate de magnesium 5.10^{-3} M pour éliminer toute trace de bacilles et d'ADN bactérien. Après avoir ajouté une goutte de chloroforme on centrifuge la suspension à faible puis forte vitesse. L'ADN de la suspension de bactériophages ainsi purifiée est extrait par addition de perchlorate de sodium 2 M (concentration finale) en présence d'EDTA 5.10^{-3}M. La solution d'ADN obtenue est dialysée contre du chlorure de sodium 2 M.

La concentration en ADN a été déterminée par la méthode de BURTON (11).

5 - Transformation

Le développement de la compétence a été effectué selon le protocole établi par ANAGNOSTOPOULOS et SPIZIZEN (3). La concentration en ADN est indiquée sur les tableaux et figures. Dans le cas où des conditions spéciales pour la transformation ont été adoptées elles sont indiquées dans les sections correspondantes.

6 - Transduction par le bactériophage SP10

Obtention d'un lysat transducteur : Une culture de B.Subtilis W23 en phase exponentielle est infectée par une suspension de bactériophages obtenue à partir d'une plaque trouble. Cette suspension est incubée à 37° pendant une nuit avec agitation. Le lysat obtenu est alors centrifugé, traité à la désoxyribonucléase (50 µg/ml) puis filtré sur membrane millipore (HA 0,45 µ).

Transduction : A partir d'une culture de la nuit effectuée sur TBAB on inocule faiblement le milieu PAB. On laisse la croissance s'effectuer jusqu'à la phase stationnaire. A 1 ml de culture on ajoute le mélange suivant : 1 ml de lysat transducteur, 0,05 ml de désoxyribonucléase 1 mg/ml et 0,05 ml de sulfate de magnésium 1 M. Après incubation une heure à 37° avec agitation, les cellules sont centrifugées, reprises dans un volume égal de milieu minimum glucosé (0,5 %) et étalées sur les milieux appropriés.

7 - Transduction par le bactériophage PBS1

Obtention d'un lysat transducteur : plusieurs méthodes ont été employées (29). L'une d'entre elles qui fournit d'une façon reproductible des lysats d'un pouvoir transducteur relativement élevé est la suivante : une culture, effectuée en milieu PAB, en phase exponentielle est infectée par une suspension de phages. La multiplicité d'infection est de l'ordre de 1. On laisse cellules et bactériophages en présence pendant 15 mn, sans agitation, à la température du laboratoire. Après avoir été diluée 20 fois la culture infectée est incubée à 37°, avec agitation, pendant 1 h 15. 5 µg/ml de chloramphénicol sont ajoutés et l'incubation avec agitation est maintenue pendant 2 heures. La culture est alors laissée à 37° sans agitation pendant 16 heures. Le lysat ainsi obtenu est centrifugé et incubé avec une solution de désoxyribonucléase puis filtré sur

sur membrane millipore (HA 0,45 µ). En absence de chloramphénicol le pouvoir transducteur du lysat est inférieur, il est possible que le chloramphénicol retarde la lyse .

Transduction : La méthode est la même que celle utilisée pour la transduction par SP10. La seule différence est que les cellules sont mises en présence des bactériophages pendant 30 minutes seulement.

8 - Transduction par le bactériophage 3NT

L'obtention des lysats transducteurs et la transduction ont été effectuées de la même façon que pour PBS1.

9 - Irradiation par les rayons UV

Les irradiations ont été effectuées à l'aide d'une lampe du type germicide General Electric G15T8.

1) Bactéries : on utilise une culture bactérienne en phase exponentielle réalisée dans du milieu minimum glucosé additionné d'hydrolysat de caséine 0,02 % et des composés nécessaires à la croissance de la souche 50 µg/ml. Les bactéries sont lavées et remises en suspension dans du milieu minimum à une densité de l'ordre de 10^8 cel/ml. Elles sont alors irradiées à une intensité de 15 ergs/mm^2/sec. La viabilité est déterminée par étalement sur milieu TBAB.

2) Bactériophage SPO 1. Avant irradiation la suspension de phages SPO 1 est diluée jusqu'à 10^7 u/ml dans du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 8,5, additionné de sulfate de magnésium 10^{-3} M. Elle est irradiée à une intensité de 10 ergs/mm^2/sec. Le nombre de centres infectieux produits sur les différentes souches est déterminé selon la technique utilisant un milieu semi solide (Difco nutrient broth). Toutes les opérations effectuées après irradiation ont été faites dans une demi-obscurité afin d'éviter les phénomènes de photoréactivation.

10 - Sensibilité à la mitomycine C.

La sensibilité à la mitomycine C a été déterminée par répliques et étalements sur milieu TBAB additionné de différentes concentrations d'antibiotique.

11 - Mesure de l'incorporation de l'ADN par les cellules compétentes

1) Préparation de l'ADN marqué : On a utilisé la souche 168MT⁻ (trpC2, thyX1, thyY1) exigeant la thymine pour sa croissance. On ensemence avec un faible inoculum un litre de milieu minimum glucosé additionné de 100 µCi de thymidine tritiée (activité spécifique 5 Ci/mM), 0,05 % d'hydrolysat de caséine et 20 µg/ml de tryptophane. Après incubation pendant une nuit les cellules sont centrifugées et l'ADN est extrait par la méthode habituelle (voir paragraphe 4).

2) Incorporation. 1 µg/ml d'ADN est ajouté à la culture compétente, à la fin de la seconde période, soit après 90 mn. Des échantillons sont prélevés à 0, 10 et 30 minutes après addition de l'ADN. Les cellules sont centrifugées, reprises dans du tampon tris-HCl 0,05 M pH 7 et traitées à la désoxyribonucléase (50 µg/ml) additionnée de sulfate de magnésium (10^{-2}M) pendant 10 mn à 37°. Après trois lavages successifs dans du milieu minimum, 0,5 ml de la suspension sont prélevés et mélangés à 1 ml d'acide trichloracétique 10 % à 0°. Les échantillons sont conservés pendant une heure à 0° puis sont filtrés sur membrane Millipore. Après plusieurs lavages avec de l'acide trichloracétique 5 % puis de l'alcool à 90 °C la membrane est séchée et mise dans 10 ml d'un liquide de scintillation de la composition suivante : 4 g de 2,5 diphényl oxazole (PPO), 50 mg de 1,4 bis 2(5 phenyl oxazolyl) benzène (POPOP) dans un litre de toluène. La radioactivité est déterminée dans un compteur à scintillation Nuclear Chicago. Le nombre de clônes transformés est déterminé séparément par étalements sur milieux appropriés.

12 - Libération de produits radioactifs après irradiation

A partir d'une culture de la nuit on inocule faiblement un milieu minimum glucosé auquel sont ajoutés 10 (µCi/ml de thymidine tritiée (activité spécifique 9 Ci/mM) 250 µg/ml de désoxyadénosine, 0,2 % d'hydrolysat de caséine et 50 µg/ml des acides aminés correspondant aux besoins de la souche. On laisse la croissance s'effectuer pendant au moins trois générations. Les cellules sont alors centrifugées, lavées trois fois par du milieu minimum glucosé puis incubées pendant quinze minutes à 37° en présence de thymidine non radioactive 20 µg/ml (pour éliminer la thymidine tritiée qui a pénétré dans les cellules mais qui n'est pas encore intégrée dans l'ADN). Après centrifugation les cellules sont reprises dans du milieu minimum et irradiées. Aux fractions irradiées et témoins on ajoute 0,05 % d'hydrolysat de caséine, 50 µg/ml des acides aminés nécessaires à la souche (en absence de ces additions les cellules se lysent) et 20 µg/ml de thymidine non radioactive. Les cellules sont incubées avec agitation à 37°, toutes les trente minutes des échantillons sont prélevés et mélangés à un volume égal d'acide trichloracétique 10 % à 0°. Après être restés au moins 1 heure à 0° les échantillons sont filtrés ; 0,1 ml du filtrat est ajouté à 15 ml d'un liquide de scintillation composé de 80 g de naphtalène, 5 g de 2,5 diphényl oxazole (PPO), 345 ml de dioxane, 345 ml de toluène et 210 ml d'éthanol. La radioactivité observée correspond au matériel acidosoluble à 0° présent dans les cellules et le milieu. La radioactivité totale des cellules avant irradiation a été déterminée par filtration sur membrane Millipore.

13 - Incorporation de thymidine tritiée après irradiation

A partir d'une culture de la nuit on inocule un milieu minimum glucosé additionné d'hydrolysat de caséine 0,2 % et des acides aminés nécessaires à la souche (50 µg/ml). On laisse la croissance s'effectuer jusqu'à la phase exponentielle. Les cellules sont alors centrifugées reprises dans du milieu minimum et diluées jusqu'à une densité de l'ordre de 10^8/ml. La suspension cellulaire est divisée en trois fractions, l'une servant de témoin

n'est pas irradiée, les deux autres sont irradiées à différentes doses. A chaque fraction sont ajoutés 2 (μCi/ml de thymidine tritiée (activité spécifique 5 Ci/mM), 250 μg/ml de désoxyadénosine, 0,2 % d'hydrolysat de caséine et 50 μg/ml des acides aminés nécessaires à la souche. Les trois fractions sont incubées à 37° avec agitation. A différents temps des échantillons sont prélevés (0,5 ml) et mélangés à 1 ml d'acide trichloracétique 10 % à 0°. Après une heure à 0° la radioactivité de 0,1 ml de la suspension est déterminée par filtration sur membrane Millipore (voir paragraphe 11).

CHAPITRE II

GROUPES DE LOCI GENETIQUES REGISSANT LA BIOSYNTHESE DE L'ISOLEUCINE, DE LA VALINE ET DE LA LEUCINE

La transformation chez Bacillus subtilis a permis l'analyse génétique de segments portant les gènes gouvernant la biosynthèse des acides aminés aromatiques (2-50), de l'histidine (20) et de l'arginine (45). Seuls les gènes qui régissent la biosynthèse du tryptophane sont tous liés c'est à dire sont situés sur un même segment d'ADN, transformant. Ce segment porte également un gène histidine, des gènes controlant la synthèse de l'acide shikimique, de la tyrosine et certains gènes de régulation de la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Nous nous sommes attachés à mettre en évidence des relations de liaison entre loci impliqués d'autres voies biosynthétiques. Nous avons trouvé deux autres groupes de liaison portant les gènes qui régissent la biosynthèse de l'isoleucine, la valine, la leucine et la méthionine. Dans un premier groupe se situent les gènes, qui contrôlent les enzymes thréonine désaminase et dihydroxyacide-déshydrase (intervenant dans la synthèse de l'isoleucine et de la valine), liés à un gène impliqué dans la synthèse de la méthionine. Le second groupe de liaison comprend le gène qui contrôle la réductoisomérase (intervenant dans la biosynthèse de l'isoleucine et de la valine) lié à un ou plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de la leucine. Au cours de cette étude des cas de liaison faible ont été mis en évidence. Les résultats ont fait l'objet de deux publications (1-5).

RESULTATS

1 - Caractéristiques des mutants.

Nous avons obtenu par irradiation aux rayons ultraviolets de la souche 168M des mutants qui nécessitent pour leur croissance soit de l'isoleucine, soit de l'isoleucine et de la valine, soit de la leucine. Les voies

de biosynthèse de ces acides aminés semblent être les mêmes chez tous les microorganismes étudiés jusqu'à présent. La séquence des réactions est représentée dans la figure 1 (23). Les voies de biosynthèse de l'isoleucine et de la valine sont parallèles et font intervenir des enzymes communs. La voie de la leucine se branche sur celle de la valine à partir de l'acide α acéto-isovalérique.

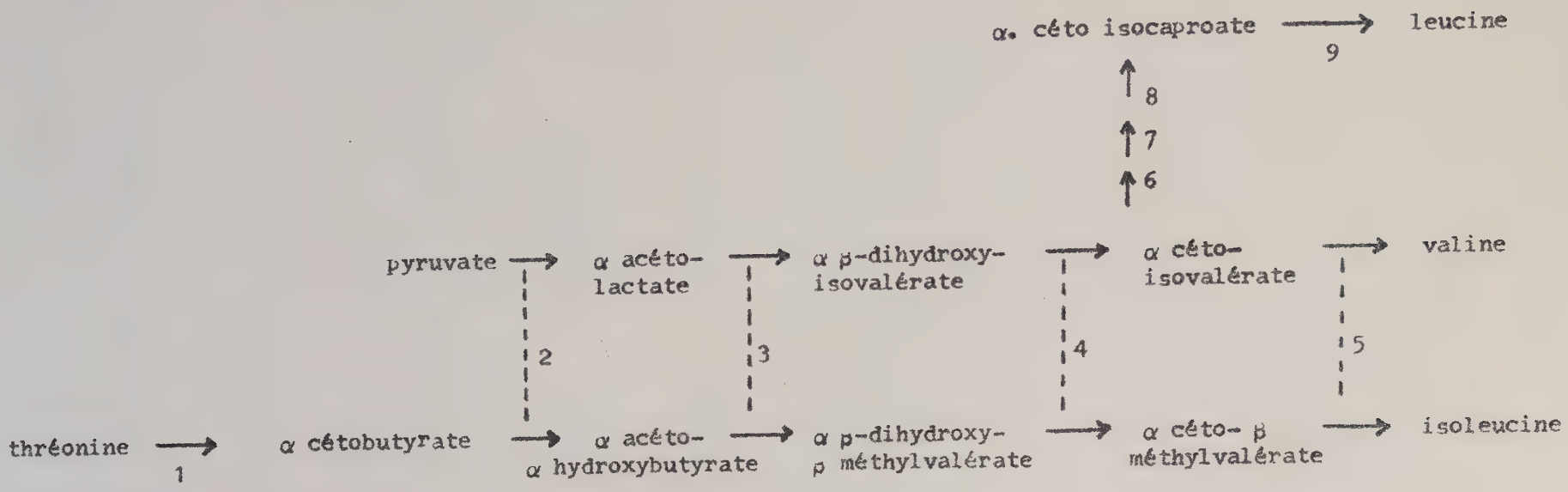
Les mutants ayant comme besoin nutritif l'isoleucine seule sont dépourvus d'activité thréonine désaminase (ilvA). Les mutants, qui nécessitent à la fois l'isoleucine et la valine, que nous avons étudiés sont dépourvus les uns d'activité réducto-isomérase (ilvC), les autres d'activité déshydrase (ilvD). Les mutants qui ont un besoin en leucine poussent tous sur céto-leucine ; l'étape biochimique interrompue n'a pas été précisée. La double exigence en isoleucine et en valine est le résultat d'une seule mutation. La mutation en retour est simultanée pour les deux besoins nutritifs, d'autre part, on ne peut pas déceler de recombinaison entre les deux caractères.

Afin d'obtenir de nouveaux mutants génétiquement liés à ceux déjà connus nous avons employé la méthode de la transformation par l'ADN de la souche sauvage traité *in vitro*, à l'acide nitreux (2 - 5). Cette technique est la suivante : une souche réceptrice portant une mutation A est transformée par cet ADN. Parmi les clones transformés A^+ il est possible de sélectionner des mutations induites par l'acide nitreux ; celles-ci sont en général situées sur le même segment d'ADN transformant que la mutation portée par la souche réceptrice. C'est ainsi que ilvD4 a été trouvé parmi les clones transformés $ilvA1^+$, de même leu-3 parmi les clones transformés $ilvC1^+$ etc.

2 - Croisements à deux facteurs en répulsion

Pour déterminer les relations de liaison entre ces différentes mutations nous avons réalisé des "croisements" à deux facteurs. Dans une première série d'expériences les deux mutations étaient en répulsion, c'est à dire l'une portée par la souche réceptrice l'autre par l'ADN donateur. Les fréquences de recombinaison observées dans les croisements réciproques sont

FIGURE 1 : Chaines de biosynthèse de l'isoleucine, de la valine et de la leucine.



Etape	Enzyme	locus génétique
1	thréonine désaminase	ilvA
2	acéto hydroxy acide synthétase	ilvB
3	α hydroxy β céto acide réductoisomérase	ilvC
4	dihydroxyacide déshydrase	ilvD
5	transaminase	ilvE

généralement du même ordre. Contrairement aux résultats obtenus chez le pneumocoque (21-22-42) les efficacités d'intégration des différents marqueurs (c'est à dire la fréquence relative de la transformation du marqueur considéré par rapport à un marqueur non lié pris comme référence) sont très voisines les unes des autres (Tableau II), le cas des marqueurs leu-1 et metB4 est l'exception. Si les efficacités d'intégration des deux marqueurs impliqués dans un croisement étaient très différentes l'une de l'autre la valeur du taux de recombinaison observée dans les croisements réciproques pourraient être différente.

Lorsque les deux mutants présentent le même phénotype le degré de liaison est déterminé par le calcul de l'indice de recombinaison RI (43) (Tableau III). Une même culture compétente de la souche portant la mutation A_1 et une mutation X non liée prise comme référence (nous avons utilisé trpC2 - besoin en tryptophane - comme marqueur de référence) est transformée par un ADN de type sauvage et par l'ADN d'une souche portant la mutation A_2.

1) $\frac{+\ +}{A_1\ +}$ $\frac{+}{X}$ $\frac{A^+}{X^+} = a$

2) $\frac{+\ A^2}{A_1\ +}$ $\frac{+}{X}$ $\frac{A^+}{X+} = b$

Dans les deux cas on détermine le rapport $\frac{A^+}{X^+}$. Il est clair que dans la seconde transformation les clones A^+ obtenus résultent de la recombinaison entre les marqueurs A_1 et A_2. L'indice de recombinaison correspond au rapport $\frac{b}{a}$.

L'ensemble des résultats des croisements à deux facteurs en répulsion est résumé dans le Tableau IV.

3 - Croisements à deux facteurs en couplage

La fréquence de recombinaison entre deux marqueurs peut être également déterminée par des croisements à deux facteurs en couplage c'est à dire

TABLEAU II : Fréquence de transformation relative des différents marqueurs.

Souche réceptrice (génotype général A trpC2) A	Rapport $A^+/trpC2^+$
ilvA1	0,33
ilvA2	0,46
ilvC1	0,59
ilvC3	0,50
ilvD2	0,60
ilvD4	0,37
leu-1	1,03*
leu-2	0,43
leu-3	0,61
metB2	0,68
metB3	0,36
metB4	2,06
phe-1	0,66

L'ADN donateur est de type sauvage. Sa concentration est limitante.

*Des valeurs supérieures à 1 ont été souvent obtenues.

TABLEAU III : Exemple de la mesure du taux de recombinaison par la méthode de l'indice de recombinaison.

Souche réceptrice (génotype)	ADN donateur	Clones transformés/ml		Rapport $\frac{leu^+}{trp^+}$ ou $\frac{ilv^+}{trp^+}$	RI x 100 =b/a x 100
		leu^+ ou ilv^+	trp^+		
leu-2 trpC2	wt	48.000	112.000	0,43 (a)	30
"	leu-1 $trpC2^+$	28.500	225.000	0,13 (b)	
ilvC1 trpC2	wt	47.700	81.000	0,59 (a)	10,5
"	ilvC3 $trpC2^+$	1.760	28.400	0,062(b)	

RI = indice de recombinaison

TABLEAU IV : Croisements à deux facteurs en répulsion.

Marqueur dans la souche réceptrice	Marqueur dans l'ADN donateur								
	ilvA1	ilvA2	ilvC1	ilvD2	ilvC3	ilvD4	leu-1	leu-2	leu-3
ilvA1	-	9,5	100	66,5	100	66	100	100	100
ilvA2	9,5	-	100	64	100	60	100	100	100
ilvC1	100	100	-	100	10,5	100	65	59	63
ilvD2	71	68	100	-	100	21	100	100	100
ilvC3	100	100	12,5	100	-	100	60	56	56,5
ilvD4	70	66	100	13	100	-	100	100	100
leu-1	100	100	78	100	74	100	-	31	11
leu-2	100	100	60	100	53	100	29,5	-	18
leu-3	100	100	65	100	64	100	12	18,5	-

La fréquence de recombinaison entre les marqueurs ilvA, ilvC, ilvD et leu est exprimée en pourcentage.

Lorsque les marqueurs sont de phénotype différent le pourcentage de recombinaison est égal à :

$$\frac{\text{nbre de clones prototrophes}}{\text{nbre total de clones transformés}} \times 100$$

Lorsque les marqueurs sont de même phénotype la fréquence de recombinaison est déterminée par la méthode de l'indice de recombinaison (voir texte et Tableau III).

la souche réceptrice portant les deux mutations, l'ADN étant de type sauvage. Pour des concentrations limitantes en ADN le pourcentage de recombinaison est constant ce qui indique bien une véritable liaison. Pour des concentrations saturantes en ADN la transformation simultanée des deux caractères peut être due à la pénétration de deux "molécules" d'ADN différentes.

4 - Mise en évidence de deux nouveaux groupes de liaison

L'ensemble de ces croisements à deux facteurs met en évidence deux groupes de liaison : d'une part les marqueurs ilvA sont liés aux marqueurs ilvD, d'autre part les marqueurs ilvC sont liés aux marqueurs leu. Des mutants ayant un besoin nutritif en méthionine (ils poussent sur homocystéine : metB) ont été obtenus en transformant une souche ilvA1 par un ADN de type sauvage traité à l'acide nitreux. Des croisements à deux facteurs ont montré une liaison entre ce groupe de mutants met et le segment ilvA - ilvD (tableau V). YOSHIKAWA et SUEOKA (72) ont également signalé une liaison entre un marqueur ilvA et un marqueur met.

5 - Cartes génétiques

Les valeurs des taux de recombinaison obtenues au cours des croisements à deux facteurs, en répulsion et en couplage, ont suggéré un ordre linéaire pour les différents marqueurs. Cet ordre a été confirmé par une série de croisements à trois facteurs (Tableau VI). Une souche réceptrice portant deux mutations est transformée par un ADN portant la troisième mutation. La classe la moins fréquente est supposée être celle qui nécessite le plus grand nombre d'événements de recombinaison. Considérons par exemple le premier croisement du Tableau VI. Deux éventualités sont possibles dans ce cas :

TABLEAU V : Mise en évidence de la liaison entre les marqueurs metB et les marqueurs ilvA et ilvD

Souche réceptrice (génotype)	Souche donatrice (génotype)	Fréquence de recombinaison - %
metB2	ilvA2	89,0
"	ilvD2	49,0
"	metB3	0,0
"	metB4	11,5
metB3	ilvD2	43,0
"	metB2	0,0
"	metB4	7,5
metB4	ilvA2	99,0
"	ilvD2	79,5
"	metB2	8,0
"	metB3	5,5
ilvD2	metB2	48,0
"	metB3	35,0
"	metB4	43,0

TABLEAU VI : Croisements à trois facteurs.

Souche réceptrice (génotype)	Souche donatrice (génotype)	Clones transformés			ordre proposé
		Classes	nombre/ml	$\frac{a}{b}$ (1)	
ilvC1 leu-1	ilvC3	ilv$^+$ leu$^-$	13.270	0,16	ilvC1 ilvC3 leu-1
		ilv$^+$ leu$^+$	2.030		
ilvC3	ilvC1 leu-1	ilv$^+$ leu$^-$	7.930	1,4	ilvC1 ilvC3 leu-1
		ilv$^+$ leu$^+$	11.110		
ilvC3 leu-2	ilvC1	ilv$^+$ leu$^-$	5.240	0,94	ilvC1 ilvC3 leu-2
		ilv$^+$ leu$^+$	4.920		
ilvC1	ilvC^3 leu-2	ilv$^+$ leu$^-$	418	41,3	ilvC1 ilvC3 leu-2
		ilv$^+$ leu$^+$	17.240		
ilvC3 leu-2	leu-3	ilv$^-$ leu$^+$	2.170	0,82	ilvC^3 leu-2 leu-3
		ilv$^+$ leu$^+$	1.785		
leu-3	ilvC3 leu-2	ilv$^-$ leu$^+$	393	45,8	ilvC3 leu-2 leu-3
		ilv$^+$ leu$^+$	18.010		
ilvC1 leu-1	leu-2	ilv$^-$ leu$^+$	7.730	0,048	ilvC1 leu-2 leu-1
		ilv$^+$ leu$^+$	370		
leu-2	ilvC1 leu-1	ilv$^-$ leu$^+$	4.490	1,07	ilvC1 leu-2 leu-1
		ilv$^+$ leu$^+$	4.810		
ilvA1 ilvD2	ilvA2	ilvA$^-$ ilvD$^+$	83.380	0,002	ilvA1 ilvA2 ilvD2
		ilvA$^+$ ilvD$^+$	170		
ilvA1 ilvD2	ilvD4	ilvA$^-$ ilvD$^+$	4.900	0,069	ilvA1 ilvD4 ilvD2
		ilvA$^+$ ilvD$^+$	340		
ilvD4	ilvA1 ilvD2	ilvA$^-$ ilvD$^+$	2.280	1,05	ilvA1 ilvD4 ilvD2
		ilvA$^+$ ilvD$^+$	2.410		

Tableau VI:(suite)

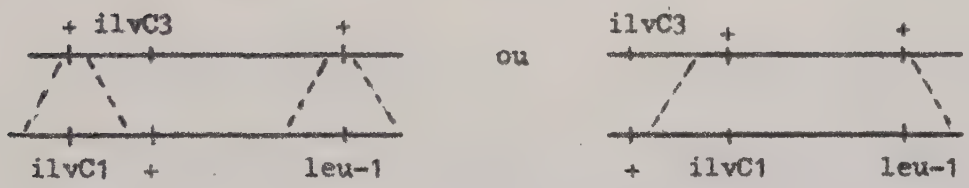
Souche réceptrice (génotype)	Souche donatrice (génotype)	Clones transformés			ordre proposé
		Classes	nombre/ml	$\frac{a}{b}$ (1)	
ilvD4 metB3	ilvD2	ilv$^+$ met$^-$	14.430	0,126	ilvD4 ilvD2 metB3
		ilv$^+$ met$^+$	1.820		
ilvD2	ilvD4 metB3	ilv$^+$ met$^-$	746	0,54	ilvD4 ilvD2 metB3
		ilv$^+$ met$^+$	404		
ilvD4 metB3	metB4	ilv$^-$ met$^+$	4.720	1,32	ilvD4 metB3 metB4
		ilv$^+$ met$^+$	6.240		

(1) a : fréquence des clones prototrophes

b : fréquence des clones transformés pour un seul marqueur

Exemple : souche réceptrice ilvC1 leu-1

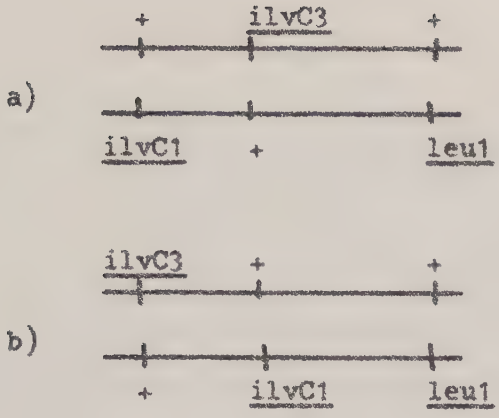
ADN donateur ilvC3



les clones ilv$^+$ sont sélectionnés

a = ilv$^+$ leu$^+$

b = ilv$^+$ leu



Si l'ordre est celui représenté en a) l'obtention de clones prototrophes nécessite quatre événements de recombinaison. Le rapport $\frac{ilvC^+\ leu^+}{ilvC^+\ leu^-}$ très faible (0,16) est en faveur de cet ordre. Nous avons effectué de nombreux croisements de ce type, ils nous ont permis d'établir sans équivoque l'ordre des marqueurs les uns par rapport aux autres. Ainsi nous avons pu construire des cartes génétiques partielles de deux nouveaux segments du génôme de B.subtilis (Fig. 2 et 3).

6 - Cas des liaisons faibles

La transformation simultanée de deux marqueurs est plus ou moins fréquente, elle dépend essentiellement de la distance entre les marqueurs considérés. Des cas de liaison faible ont été mis en évidence chez Diplococcus pneumoniae (48). Par contre chez Bacillus subtilis au cours de l'étude du segment portant les gènes de biosynthèse du tryptophane, qui pourtant comporte 13 gènes connus, de telles liaisons n'ont pas été observées. Sur le segment ilvA - ilvC - metB que nous venons de décrire la cotransformation des marqueurs ilvA2 et metB4 est très faible, de l'ordre de 1 % avec les préparations d'ADN utilisées. La présence des marqueurs ilvD, intermédiaires,

Figure 2 : Carte génétique du segment ilvA1 metB4

Cette carte a été établie d'après les résultats de transformation présentés dans les tableaux IV, V et VI. Les nombres indiqués correspondent aux pourcentages de recombinaison (moyenne des valeurs obtenues dans les croisements réciproques).

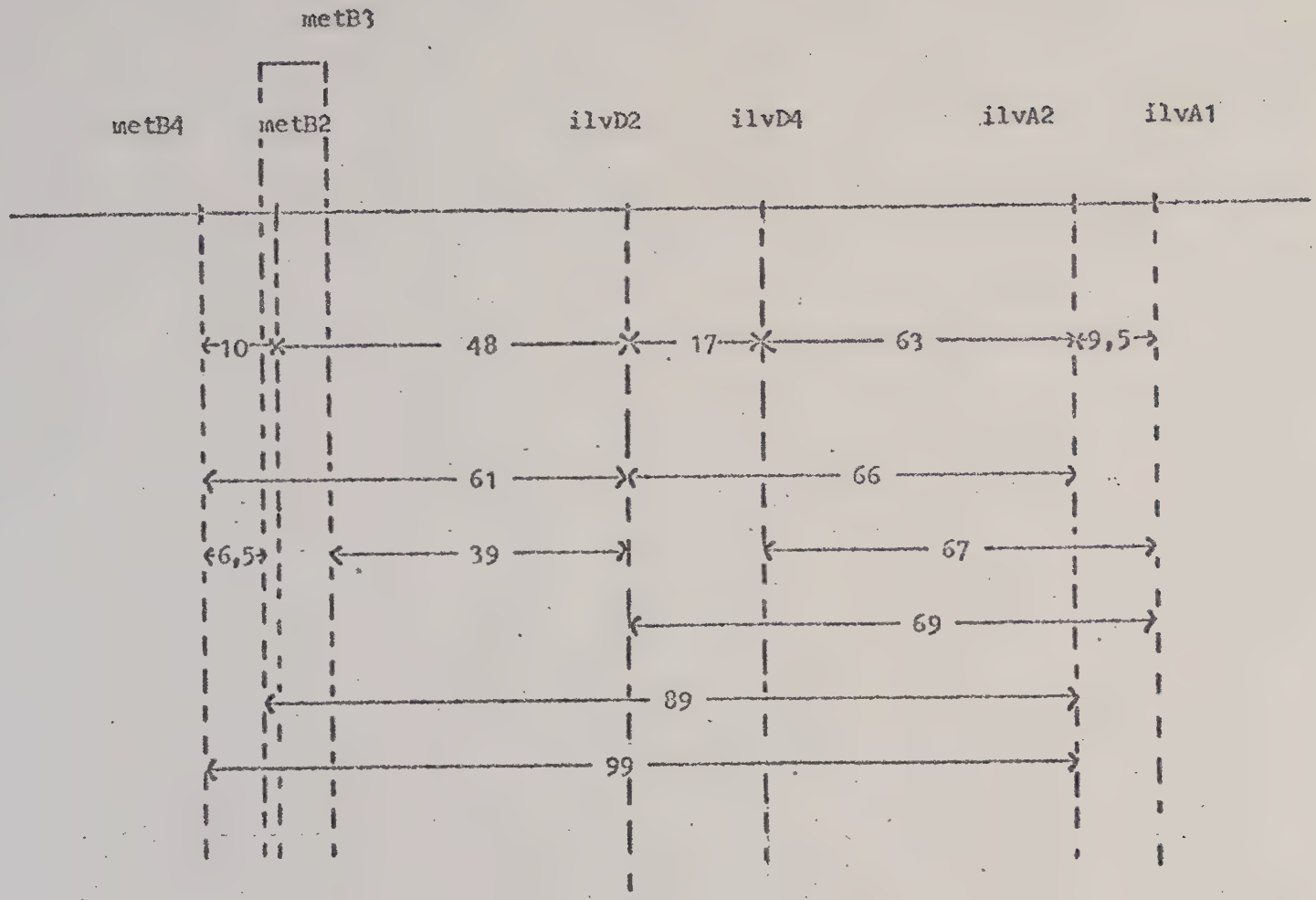
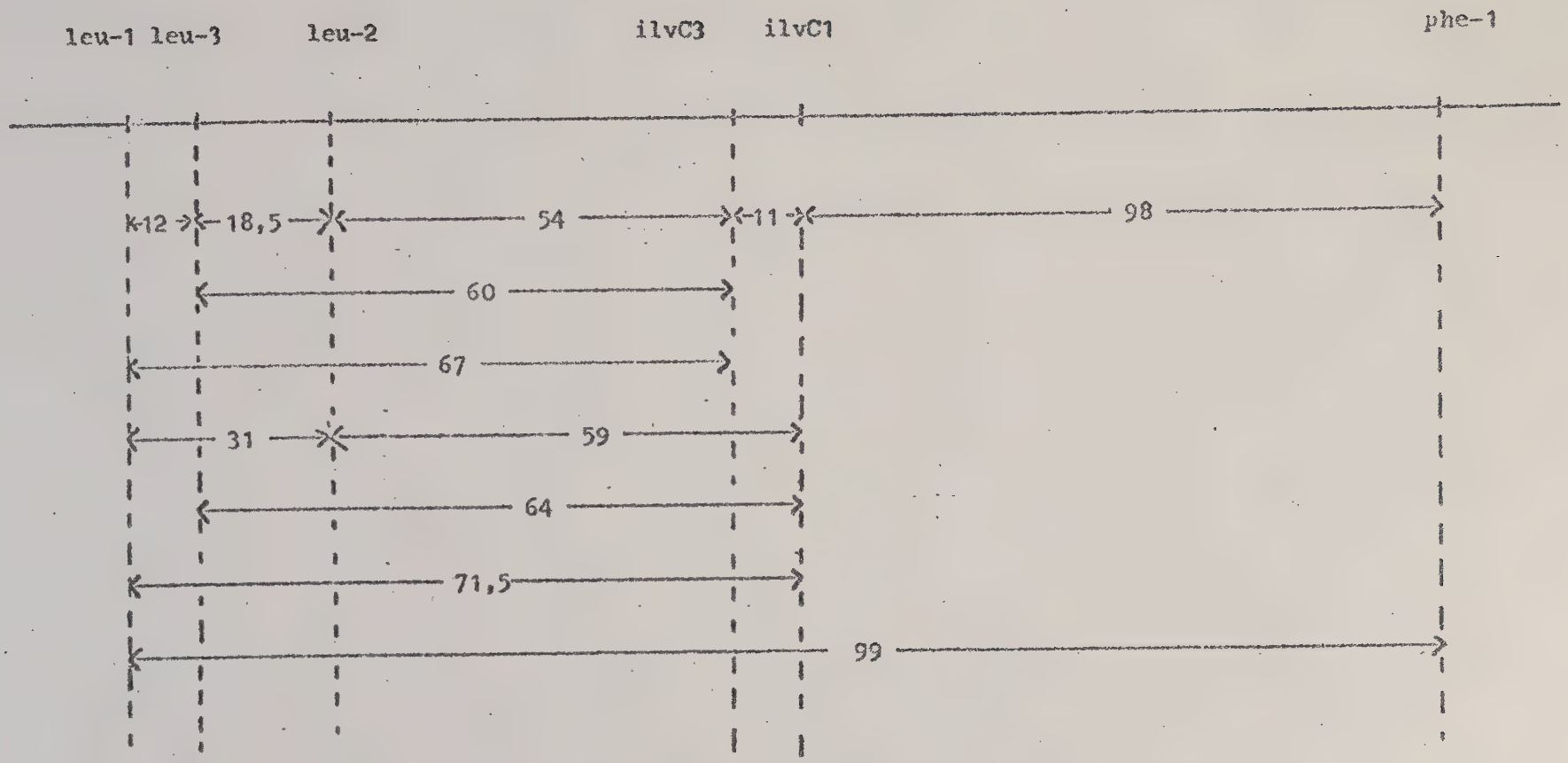

metB3
metB4
metB2
ilvD2
ilvD4
ilvA2
ilvA1
10
48
17
63
9,5
61
66
6,5
39
67
69
89
99

Figure 3 : Carte génétique du segment leu-1 phe-1

Cette carte a été établie d'après les résultats de transformation présentés dans les tableaux IV, VI et VII. Les nombres indiqués correspondent aux pourcentages de recombinaison (moyenne des valeurs obtenues dans les croisements réciproques).


leu-1
leu-3
leu-2
ilvC3
ilvC1
phe-1
K-12
18,5
54
11
98
60
67
31
59
64
71,5
99

permet d'établir sans équivoque l'existence d'une liaison entre ces deux mutations. Un autre cas de liaison faible a été mis en évidence. Par transformation d'une souche ilvC1 à l'aide de l'ADN de la souche sauvage traité à l'acide nitreux nous avons obtenu un mutant exigeant la phénylalanine pour sa croissance. De la même façon en utilisant cette souche phe-1 comme réceptrice nous avons sélectionné parmi les transformées phe$^+$ le mutant ilvC3. Le pourcentage de recombinaison entre cette mutation phe-1 et les marqueurs ilvC ou leu est très faible, 1 à 2 %. Aucun autre marqueur n'a pu être localisé entre ces deux mutations. Le problème s'est donc posé de savoir si ce très faible cotransfert correspondait à une véritable liaison physique sur le génôme. La souche portant les deux mutations phe-1 et leu-1 a été transformée par un ADN de type sauvage à une concentration limitante. L'influence du degré de compétence de la culture sur la fréquence des doubles transformées, négligeable dans le cas de liaison forte, a ici son importance. En effet, cette fréquence est d'autant plus élevée que le nombre de cellules compétentes dans la population est faible, il peut en résulter une apparente liaison. Le Tableau VII montre que la fréquence des doubles transformées phe-1$^+$ leu-1$^+$ est supérieure à celle attendue dans un cas d'indépendance des deux marqueurs même en tenant compte du pourcentage de cellules compétentes. D'autre part lorsqu'on utilise un mélange d'ADN phe-1 leu-1$^+$ et phe-1$^+$ leu-1 la fréquence de phe$^+$ leu$^+$ obtenue est très inférieure à celle observée avec un ADN de type sauvage à de très faibles concentrations. Nous avons également étudié la cinétique de la transformation simultanée des deux caractères en fonction de la concentration en ADN (Fig. 4). La courbe obtenue montre que la dilution de l'ADN entraine une diminution progressive de la valeur du cotransfert jusqu'à 1 %, puis cette valeur reste stable quelque soit les dilutions ultérieures. Cette cinétique est très en faveur d'une véritable liaison physique.

D'après ces résultats ont peut émettre l'hypothèse que la transformation simultanée, très peu fréquente, des marqueurs phe-1 et ilvC ou leu de même que ilvA1 et metB4 est due à la présence de segments ayant une longeur supérieure à la longueur moyenne des segments dans les préparations

TABLEAU VII : Liaison par transformation entre les marqueurs phe-1 et leu-1

ADN donateur		clones transformés/ml			cel. compétentes	nombre théorique de
génotype	concentration	phe$^+$	leu$^+$	phe$^+$ leu$^+$	% (2)	phe$^+$ leu$^+$/ml
type sauvage	0,0007 γ/ml	3.965	5.130	49,6(1)	-	2,9(3)
mélange de (phe-1+ leu-1$^-$) et (phe-1 leu-1$^+$)	0,0007 γ/ml de chaque type	5.090	7.325	5,36	6,32	-

(1) Valeur moyenne

(2) Pourcentage de cellules compétentes dans la population

$$= \frac{\text{nombre de clones transformés phe-1}^+ \times \text{nombre de clones transformés leu-1}^+}{\text{nombre de clones transformés phe-1}^+ \text{ leu-1}^+ \times \text{nombre total de cellules viables}} \times 100$$

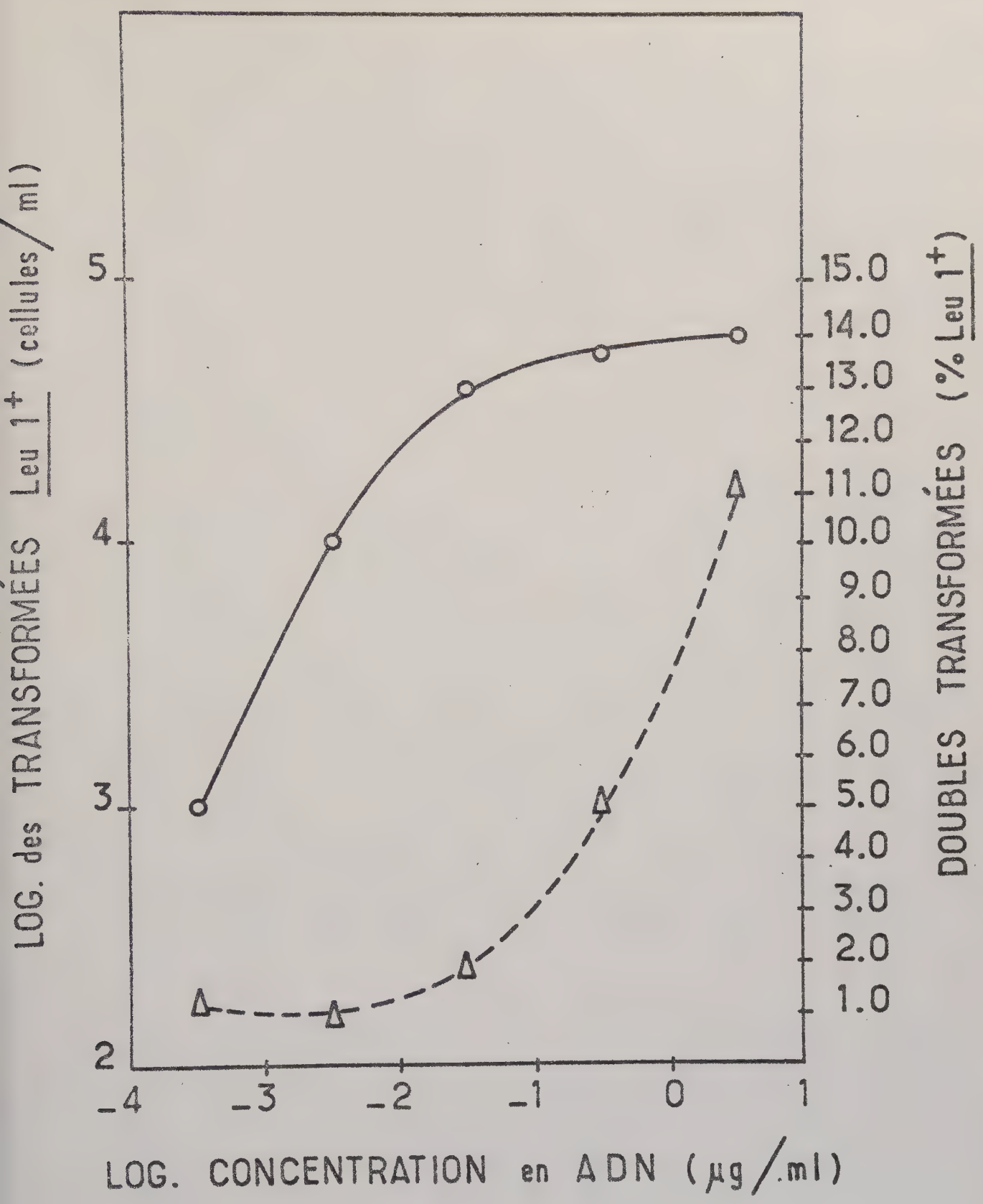
Le nombre total de cellules viables dans cette expérience était $1{,}1\ 10^8$/ml

(3) Nombre de clones transformés phe$^+$ leu$^+$ attendu dans un cas d'indépendance en tenant compte du nombre de cellules compétentes.

Figure 4 : Effet de la concentration en ADN sur le cotransfert des marqueurs leu-1$^+$ et phe-1$^+$. La souche réceptrice est GSY 230 leu-1 phe-1. L'ADN donateur est de type sauvage.

- o - Log des transformées leu-1$^+$ (cellules/ml)

- Δ - Cotransfert leu-1$^+$ phe-1$^+$ en % des simples transformées leu-1$^+$


LOG. des TRANSFORMÉES Leu 1+ (cellules/ml)
DOUBLES TRANSFORMÉES (% Leu 1+)
LOG. CONCENTRATION en ADN (µg/ml)
5
4
3
2
15.0
14.0
13.0
12.0
11.0
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
-4
-3
-2
-1
0
1

d'ADN employées. Pour tenter de vérifier cette hypothèse nous avons réalisé des transformations en utilisant des "lysats bruts" ou des préparations d'ADN extraites par des méthodes permettant de conserver des fibres éventuellement plus longues (voir Chap. I). A des concentrations en ADN inférieures à 0,004 µg/ml la valeur du cotransfert est de 3 à 5 %. En soumettant une telle préparation à des forces physiques de nature à fragmenter les fibres d'ADN telles que le passage rapide à travers un tube capillaire très fin on observe une diminution voir une perte de cotransfert des marqueurs considérés.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats que nous venons de présenter mettent en évidence deux nouveaux groupes de liaison sur lesquels sont situés les gènes qui régissent la biosynthèse de l'isoleucine, de la valine et de la leucine. Les gènes qui contrôlent la thréonine désaminase, *ilvA*, et la déshydrase *ilvD*, sont liés. Le gène qui controle la réductoisomérase, *ilvC*, se situe sur un autre segment d'ADN transformant lié à un ou plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de la leucine. Récemment un autre gène de la chaine de biosynthèse de l'isoleucine et de la valine a été localisé sur le segment, il s'agit du gène de l'acéto hydroxyacide synthétase *ilvB* (44). Chez *E.coli* (56-73) et *S.thyphimurium* (4-25) tous les gènes qui régissent la biosynthèse de l'isoleucine et de la valine sont liés, par contre les gènes *leu* sont situés dans une autre région du chromosome. L'ordre des gènes établi chez *E.coli* (73) est *ilvB*, *ilvC*, *ilvA*, *ilvD*, *ilvE* et chez *S.thyphimurium* (4) *ilvC*, *ilvA*, *ilvD*, *ilvE*.

De nombreux croisements à deux et trois facteurs nous ont permis d'établir des cartes génétiques partielles de deux nouveaux segments d'ADN. Deux cas de liaison très faible ont été mis en évidence. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer le phénomène des faibles cotransferts est que, dans nos préparations d'ADN, subsistent des fragments dont la longueur est supérieure à celle de la plupart des segments transformants.

Cette hypothèse s'est trouvée renforcée par les résultats que nous avons obtenus à l'aide de la transduction par le bactériophage PBS1. Ce sera l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA TRANSDUCTION PAR PBS1 DANS LES REGIONS argA - nic38 et lys-1 - ilvA - CONSTRUCTION DE CARTES GENETIQUES PAR TRANSDUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté des résultats indiquant que certains marqueurs, en particulier leu-1 et phe-1 , étaient transférés simultanément par transformation avec une fréquence très faible (1 à 5 %). Nous avons pensé qu'en utilisant le bactériophage PBS1, isolé par TAKAHASHI (61) nous pourrions déterminer si ce cotransfert signifie que les deux marqueurs sont portés par le même segment d'ADN. Ce bactériophage de B.subtilis est tempéré ; il peut être propagé sur la souche transformable 168M et effectuer sur cette même souche une transduction du type généralisé (62). Il est d'une taille particulièrement importante ; le volume de la tête dont le diamètre est de l'ordre de 100 mμ est supérieur à celui du phage T_4 (62). Très récemment la structure de ce phage a été précisée (18).Le poids moléculaire de l'ADN des particules infectieuses a été déterminé (34), il est de $1,9 .10^8$. Cet ADN présente deux particularités: d'une part la thymine est remplacée par l'uracile, d'autre part il contient un autre sucre qui a été identifié comme étant le glucose et qui est lié vraisemblablement à la guanine ou la cytosine (64-65).Chez E.coli il a été montré par centrifugation en gradient de sucrose que les fragments d'ADN contenus dans les particules transductrices du bactériophage P1 ont la même taille que le génome du phage (35). Aussi on peut espérer que la taille du fragment d'ADN bactérien transféré par ce phage sera supérieure à celle des segments d'ADN transformant, obtenus par des méthodes classiques, qui ont un poids moléculaire de 2.10^7 en moyenne. De ce fait, il serait possible de résoudre les problèmes posés par l'étude des très faibles fréquences de cotransfert de certains marqueurs en transformation.

Dans ce chapitre nous exposerons les résultats obtenus par transduction avec le bactériophage PBS1. Ces résultats nous ont permis de confirmer que les marqueurs très faiblement liés par transformation sont réellement situés non loin l'un de l'autre sur le chromosome, et en outre d'étendre les cartes génétiques établies d'après les expériences de transformation. Au cours de ce travail il est apparu que la valeur du taux de recombinaison entre deux marqueurs liés était très différente selon la méthode d'analyse employée, transformation ou transduction par PBS1. On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène, deux d'entre elles seront plus particulièrement examinées dans ce chapitre. Une partie de ces résultats a été publiée (5).

RESULTATS

I - Croisements par transduction à l'aide du phage PBS1

1. Cotransfert par PBS1 de marqueurs faiblement liés en transformation

Nous avons tout d'abord examiné si les marqueurs leu-1 et phe-1 très faiblement liés en transformation, étaient transférés simultanément par PBS1. Des souches doublement marquées leu-1 - phe-1 ont été transduites à l'aide d'une suspension de bactériophages qui avaient été propagés sur la souche WT. Le tableau VIII montre que le cotransfert de ces deux marqueurs, par l'intermédiaire de PBS1 est de 63 %. De même le marqueur ilvC1 lié par transformation à leu-1, et le marqueur phe-1 sont cotransduits avec une forte fréquence : 76,8 %. Par contre il n'y a aucune cotransduction de ilvC1 ou leu-1 avec trpC2. D'après ces résultats l'hypothèse selon laquelle les mutations leu-1 et phe-1 seraient situées non loin l'une de l'autre sur le chromosome bactérien parait confirmée. D'autre part ces résultats établissent que le bactériophage PBS1 transfère avec une forte fréquence des fragments d'ADN dont la taille est supérieure à celle des segments transformants.

TABLEAU VIII : Transduction par le bactériophage PBS1. Cotransfert des marqueurs leu-1 ou ilvC1 avec le marqueur phe-1

Souche réceptrice (génotype)	Clones transduits		Cotransfert % moyen
	Classes	nombre/ml	
phe-1 leu-1	phe-1$^+$ leu-1	458	61,5
	phe-1 leu-1$^+$	367	
	phe-1$^+$ leu-1$^+$	670	
phe-1 leu-1 trpC2	phe-1 leu-1$^+$ trpC2	410	
	phe-1$^+$ leu-1$^+$ trpC2	740	phe-1 leu-1 64,3
	phe-1 leu-1$^+$ trpC2$^+$	0	leu-1 trpC2 0,0
	phe-1$^+$ leu-1$^+$ trpC2$^+$	0	phe-1 trpC2 0,0
	phe-1 leu-1 trpC2$^+$	843	
phe-1 ilvC1	phe-1$^+$ ilvC1	762	76,8
	phe-1$^+$ ilvC1$^+$	2531	

- La souche donatrice est de type sauvage.
- Le cotransfert a été calculé comme suit :

$$\frac{\text{nombre de clones transduits pour les 2 marqueurs}}{\text{nombre de clones sélectionnés}} \times 100$$

- La valeur indiquée correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour chacun des deux marqueurs sélectionnés.

2. Fréquence de recombinaison entre marqueurs fortement liés.

Nous avons déterminé, par transduction, les fréquences de recombinaison entre mutations dont les relations de liaison étaient déjà connues par transformation. Tous les marqueurs liés par transformation sont également cotransférés avec une forte fréquence au cours de la transduction. Cependant les valeurs du taux de recombinaison sont beaucoup plus faibles (Tableau IX). Par exemple la fréquence de recombinaison entre ilvC1 et leu-1 est de 3 % alors qu'en transformation elle est en moyenne de 71 %. De même pour le couple de marqueurs trpC2 his-2 elle est de 4 % alors qu'en transformation elle est de 45 %. On pourrait imaginer que le processus de la recombinaison n'est pas le même en transformation et en transduction. EPHRATI-ELIZUR et FOX (19) ont effectué une étude comparative du degré de liaison entre mutations en transformation et en transduction par le bactériophage SP10 ; celui-ci est propagé sur la souche B.subtilis 23 (peu transformable) mais il est capable de transduire la souche 168M. Ces auteurs ont étudiés les fréquences de recombinaison entre marqueurs situés sur le segment d'ADN transformant qui porte les gènes de la biosynthèse du tryptophane. Les relations de liaisons sont les mêmes quelque soit la méthode d'analyse, les fréquences de recombinaison entre marqueurs sont semblables.

3. Mise en évidence des liaisons entre marqueurs non liés par transformation

Puisque le bactériophage PBS1 semble transférer avec une forte fréquence des fragments d'ADN bactérien plus longs que les segments d'ADN transformants, nous avons pensé qu'il serait possible de mettre en évidence de nouvelles relations de liaison. Nous avons réalisé de nombreux croisements entre marqueurs non liés par transformation. Tout d'abord il faut noter que les fréquences relatives de transduction pour les différents marqueurs sont voisines les unes des autres (Tableau X), elles sont sans rapport avec celles obtenues par transformation. Par exemple la fréquence relative de transduction de metB4 qui est de 2 en transformation n'est ici que de 0,46. Deux types de croisements ont été effectués, les marqueurs étant situés

TABLEAU IX : Fréquence de la recombinaison par transduction et transformation de marqueurs fortement liés.

Souche réceptrice (génotype)	Fréquence de la recombinaison - %	
	transduction par PBS1	transformation
trpB3 his-2	4,5	28,5 - 19(1)
trpB3 trpC2	3	17
trpC2 his-2	4	45 - 23
trpC2 aro-2	8,5	54
ilvC1 leu-1	3	65 - 78
ilvA1 ilvD4	11,5	68
ilvA1 metB3	10,5	-
ilvD2 metB3	4,5	35
ilvD4 metB4	4,5	43 - 79
nic-38 phe-2	8	40
lys-1 rib-2	8	55
lys-1 ser-1	24,5	92
ser-1 rib-2	21	63

(1) On a indiqué deux valeurs lorsque la fréquence de recombinaison est très différente selon le marqueur sélectionné.

TABLEAU X : Fréquence relative de transduction de différents marqueurs.

Souche réceptrice : génotype général $\underline{A}_{A}$ trpC2	Rapport $A^+/trpC2^+$
ilvA2	0,9
ilvC1	1,4
leu-1	1,8
metB3	0,8
metB4	0,45
phe-1	1,8
argA2	1,2
lys-1	1,4

soit en répulsion,soit en couplage. Les résultats de ces expériences (Tableaux XI, XII et XIII) montrent que :

1) Les liaisons,entre marqueurs faiblement cotransférés au cours de la transformation, qui avaient été suggérées sont confirmées, c'est le cas de leu-1 phe-1, ilvC1 phe-1, ilvA2 met B3.

2) Certains couples de marqueurs situés sur des segments d'ADN différents ne sont pas, non plus, cotransduits. C'est le cas de ilvA2 phe-1, lys-1 phe-1 (Tableaux XI et XII), leu-1 metB4, ilvC1 trpC2 (Tableau XI).

3) De nouvelles relations de liaison sont mises en évidence, ainsi un marqueur argA est lié à leu-1 et phe-1. Les gènes ilvA et metB sont cotransférés avec des marqueurs situés sur le segment portant les gènes de biosynthèse du tryptophane (segment try) ainsi la fréquence de recombinaison entre ilvA2 et trpC2 est de 50 %, metB3 et trpC2 46,5 %, metB3 et his-2 43 % (Tableaux XI et XIII) ; d'autre part les mutations lys-1, rib-2, sont cotransduites avec trpC2 et ilvA2 (Tableaux XI et XII et XIII). Les résultats de l'ensemble des croisements à deux facteurs que nous avons étudiés suggèrent un ordre linéaire des marqueurs au sein de deux grands groupes de liaison. Il y aurait d'une part le segment argA - leu - ilvC - phe - mic, d'autre part le segment lys - rib - ser - trpC - his - metB - ilvD - ilvA. Ce second fragment regroupe d'une façon linéaire trois segments d'ADN transformant préalablement étudiés. L'ordre linéaire de ces marqueurs indique que ceux-ci sont situés sur un même segment d'ADN transféré par le bactériophage transducteur. A la même époque où nous poursuivions ce travail KELLY et PRITCHARD (39) ont mis en évidence une relation de liaison entre metB3 et trpC2 d'une part, rib-2 et trpC2 d'autre part par la transformation. Ils extraient l'ADN par une méthode qui permet de conserver des segments beaucoup plus longs. Les liaisons qu'ils observent sont faibles et disparaissent après dilution de l'ADN, mais il est possible de les conserver en ajoutant comme protecteur soit de l'ADN homologue, soit de l'ADN d'une autre espèce comme par exemple E.Coli.

TABLEAU XI : Transduction par PBS1. Croisements à deux facteurs entre marqueurs non liés par transformation.

Souche réceptrice (génotype)	Clones transduits		Recombinaison
	Classes	nombre/ml	% moyen
ilvA2 trpC2	ilvA2$^+$ trpC^2	760	
	ilvA2 trpC2$^+$	770	50,5
	ilvA2$^+$ trpC2$^+$	753	
metB3 trpC2	metB3$^+$ trpC2	564	
	metB3 trpC2$^+$	716	46,5
	metB3$^+$ trpC2$^+$	732	
metB3 his-2	metB3$^+$ his-2	170	
	metB3 his-2$^+$	177	43,0
	metB3$^+$ his-2$^+$	231	
ilvA2 lys-1	ilvA2$^+$ lys-1	407	
	ilvA2 lys-1$^+$	457	75,0
	ilvA2$^+$ lys-1$^+$	143	
ilvA2 phe-1	ilvA2$^+$ phe-1	640	
	ilvA2 phe-1$^+$	1000	100
	ilvA2$^+$ phe-1$^+$	0	
lys-1 trpC2	lys-1$^+$ trpC2	1066	
	lys-1 trpC2$^+$	560	33,0
	lys-1$^+$ trpC2$^+$	1775	
leu-1 metB4 trpC2	leu-1 metB4$^+$ trpC2$^+$	1066	
	leu-1 metB4 trpC2$^+$	1577	metB4 trpC2 59,5
	leu-1$^+$ metB4 trpC2$^+$	0	metB4 leu-1 100
	leu-1$^+$ metB4$^+$ trpC2$^+$	0	

Tableau XI : (suite)

Souche réceptrice (génotype)	Clones transduits		Recombinaison % moyen
	Classes	nombre/ml	
argA1 trpC2	argA1$^+$ trpC2	280	
	argA1 trpC2$^+$	235	100
	argA1$^+$ trpC2$^+$	0	
argA1 leu-1	argA1$^+$ leu-1	612	
	argA1 leu-1$^+$	1516	49,0
	argA1$^+$ leu-1$^+$	1007	
nic-38 phe-2 ilvC1	nic-38$^+$ ilvC1	394	
	nic-38 ilvC1$^+$	397	nic-38 ilvC1 28,5
	nic-38$^+$ ilvC1$^+$	998	
ilvC1 trpC2	ilvC1$^+$ trpC2	242	
	ilvC1 trpC2$^+$	172	100
	ilvC1$^+$ trpC2$^+$	0	

- La souche donatrice est de type sauvage.
- La fréquence de recombinaison correspond à :

$$\left(1 - \frac{\text{nombre de clones transduits pour les 2 marqueurs}}{\text{nombre de clones sélectionnés}}\right) \times 100$$

- La valeur indiquée correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour chacun des deux marqueurs sélectionnés.

TABLEAU XII : Transduction par PBS1 - Croisements à deux facteurs en répulsion.

Souche réceptrice (génotype)	Souche donatrice (génotype)	Clones transduits		Recombinaison
		Classe	nombre/ml	%
leu-1	phe-1	phe-1 leu-1$^+$	1303	32,0
		phe-1$^+$ leu-1$^+$	613	
ilvC1	"	phe-1 ilvC1$^+$	894	32,5
		phe-1$^+$ ilvC1$^+$	430	
argA1	"	phe-1 argA1$^+$	207	80,0
		phe-1$^+$ argA1$^+$	827	
lys-1	"	phe-1 lys-1$^+$	2	98,2
		phe-1$^+$ lys-1$^+$	830	
phe-1	ilvA2	phe-1$^+$ ilvA2	0	
		phe-1$^+$ ilvA2$^+$	1283	100,0
ilvA2	metB3	ilvA2$^+$ metB3	70	18,0
		ilvA2$^+$ metB3$^+$	16	
ilvA1	"	ilvA1$^+$ metB3	226	22,0
		ilvA1$^+$ metB3$^+$	64	
metB3	trpC2	metB3$^+$ trpC2	665	49,0
		metB3$^+$ trpC2$^+$	635	
lys-1	"	lys-1$^+$ trpC2	480	37,5
		lys-1$^+$ trpC2$^+$	287	

La fréquence de la recombinaison correspond à :

$$\frac{\text{nombre de clones prototrophes}}{\text{nombre de clones transduits}} \times 100$$

TABLEAU XIII : Transduction par PBS1. Croisements à deux facteurs en couplage dans la région lys-1 trpC2

Souche réceptrice (génotype)	Clones transduits				Fréquence de la recombinaison %
	marqueur sélectif	échantillon	classes	effectif	
lys-1 rib-2	lys-1$^+$	830	lys-1$^+$ rib-2	74	8
			lys-1$^+$ rib-2$^+$	736	
	rib-2$^+$	602	rib-2$^+$ lys-1	39	
			rib-2$^+$ lys-1$^+$	563	
lys-1 ser-1	lys-1$^+$	624	lys-1$^+$ ser-1	185	24,5
			lys-1$^+$ ser-1$^+$	439	
	ser-1$^+$	384	ser-1$^+$ lys-1	72	
			ser-1$^+$ lys-1$^+$	312	
ser-1 rib-2	ser-1$^+$	350	ser-1$^+$ rib-2	34	21
			ser-1$^+$ rib-2$^+$	316	
	rib-2$^+$	369	rib-2$^+$ ser-1	118	
			rib-2$^+$ ser-1$^+$	251	
ser-1 trpC2	ser-1$^+$	661	ser-1$^+$ trpC2	205	31
			ser-1$^+$ trpC2$^+$	456	
	trpC2$^+$	489	trpC2$^+$ ser-1	151	
			trpC2$^+$ ser-1$^+$	338	
trpC2 rib-2	trpC2$^+$	1120	trpC2$^+$ rib-2	290	34
			trpC2$^+$ rib-2$^+$	830	
	rib-2$^+$	621	rib-2$^+$ trpC2	41	
			rib-2$^+$ trpC2$^+$	580	

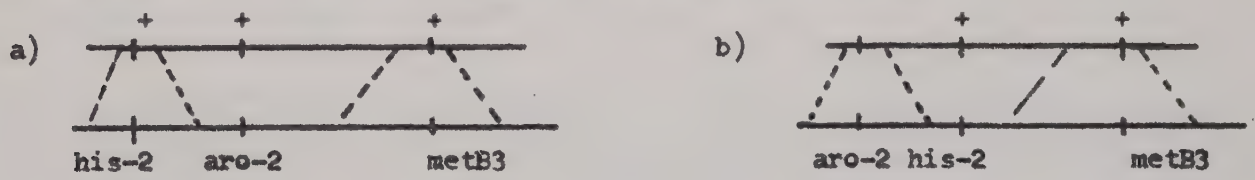
Tableau XIII (suite)

- La souche donatrice est de type sauvage.
- La fréquence de recombinaison a été déterminée comme il est indiqué dans le Tableau XI.

Les informations fournies par les croisements précédemment décrits ne sont cependant pas assez précises pour pouvoir établir sans ambiguité l'ordre de certains marqueurs les uns par rapport aux autres. En particulier il est difficile, d'après ces résultats, de définir l'orientation du "segment try" par rapport aux segments adjacents. Par exemple la fréquence de recombinaison entre metB3 et trpC2 est très voisine de celle obtenue entre metB3 et his-2. De même l'ordre des marqueurs lys-1 et rib-2 par rapport à ser-1 et trpC2 ne peut être clairement défini. Nous avons alors effectué des croisements à trois facteurs qui nous ont permis d'établir avec précision l'ordre de tous les marqueurs et de construire ainsi les cartes génétiques des deux régions.

4. Croisements à trois facteurs.

Le principe des croisements à trois facteurs est le même que celui mentionné à propos des expériences de transformation, la classe la moins fréquente est supposée être celle qui nécessite quatre événements de recombinaison. Pour déterminer l'orientation du "segment try" par rapport aux segments adjacents nous avons construit des souches portant trois mutations, ainsi aro-2 his-2 metB3, lys-1 aro-2 his-2. La fréquence de recombinaison entre deux mutations situées sur le même segment d'ADN transformant étant très faible nous avons choisi les marqueurs his-2 et aro-2 dont la fréquence de recombinaison est de 70 % par transformation. Considérons le croisement dans lequel la souche réceptrice est metB3 aro-2 his-2 et la souche donatrice de type sauvage. Il y a deux possibilités



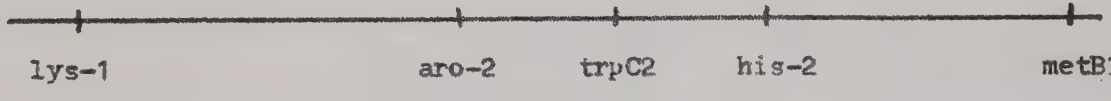
Si le marqueur sélectif est his-2$^+$ la classe his-2$^+$ aro-2 metB3$^+$ qui nécessite un quadruple événement sera très faible par comparaison à la classe his-2$^+$ aro-2 metB3 si l'ordre est celui représenté en a) ; par

contre ces deux classes seront peu différentes si l'ordre est celui indiqué en b). L'effectif de la classe his-2$^+$ aro-2 metB3$^+$ sera supérieure à celui des clones his-2$^+$ aro-2 metB3 puisque la fréquence de recombinaison entre his-2 ou aro-2 et metB3 est inférieure à 50 %. D'après le Tableau XIV 6 clones sont his-2$^+$ aro-2 metB3 et 16 sont his-2$^+$ aro-2 metB3$^+$ ce qui est en faveur de l'ordre b).

Si le marqueur sélectif est aro-2$^+$ la classe aro-2$^+$ his-2 metB3$^+$ sera peu différente mais supérieure à aro-2$^+$ his-2 metB3 si l'ordre est supérieur à celui représenté en a), par contre elle lui sera très inférieure si l'ordre est b). Le Tableau XIV montre que 1 clone est du premier type alors que 23 sont du second ce qui est en faveur de l'ordre b). Si le marqueur sélectif est metB3$^+$ la classe la plus faible sera dans le cas a) metB3$^+$ aro-2 his-2$^+$, dans le cas b) metB3$^+$ aro-2$^+$ his-2 23 clones sont du premier type, 1 seul du second ce qui favorise l'ordre b).

Ces résultats montrent sans équivoque que l'ordre est en fait celui indiqué en b), c'est à dire aro-2 his-2 metB3.

L'ordre lys aro-2 his-2 a été établi de la même façon par des croisements analogues (Tableau XIV). Nous avons également effectué des croisements dans lesquels la souche réceptrice portait deux mutations metB3 his-2 ou lys-1 his-2, la souche donatrice portait le marqueur trpC2. Les résultats indiqués dans le Tableau XV confirment l'ordre précédemment proposé. L'orientation du "segment try" se trouve ainsi clairement définie par rapport aux segments adjacents :



L'ordre des marqueurs lys-1 rib-2 ser-1 par rapport au "segment try" a été également précisé par des croisements à trois facteurs. Ces trois mutations sont situées sur un même segment d'ADN transformant dans l'ordre

TABLEAU XIV : Transduction par PBS1. Croisements à trois facteurs en couplage dans la région lys-1 metB3.

Souche réceptrice (génotype)	Clones transduits			Ordre proposé
	marqueur sélectif	classes	nombre	
metB3 aro-2 his-2	metB3$^+$	metB3$^+$ his-2 aro-2$^+$	1	
		metB3$^+$ his-2$^+$ aro-2	23	aro-2 his-2 metB3
		metB3$^+$ his-2$^+$ aro-2$^+$	187	
		metB3$^+$ his-2 aro-2	231	
	aro-2$^+$	aro-2$^+$ his-2 metB3$^+$	1	
		aro-2$^+$ his-2$^+$ metB3	187	aro-2 his-2 metB3
		aro-2$^+$ his-2$^+$ metB3$^+$	125	
		aro-2$^+$ his-2 metB3	23	
	his-2$^+$	his-2$^+$ aro-2 metB3$^+$	16	
		his-2$^+$ aro-2$^+$ metB3	316	aro-2 his-2 metB3
		his-2$^+$ aro-2$^+$ metB3$^+$	266	
		his-2$^+$ aro-2 metB3	6	
lys-1 aro-2 his-2	lys-1$^+$	lys-1$^+$ aro-2 his-2$^+$	0	
		lys-1$^+$ aro-2$^+$ his-2	15	lys-1 aro-2 his-2
		lys-1$^+$ aro-2$^+$ his-2$^+$	326	
		lys-1$^+$ aro-2 his-2	297	
	aro-2$^+$	aro-2$^+$ his-2 lys-1$^+$	5	
		aro-2$^+$ his-2$^+$ lys-1	92	lys-1 aro-2 his-2
		aro-2$^+$ his-2$^+$ lys-1$^+$	183	
		aro-2$^+$ his-2 lys-1	5	

Tableau XIV : (suite)

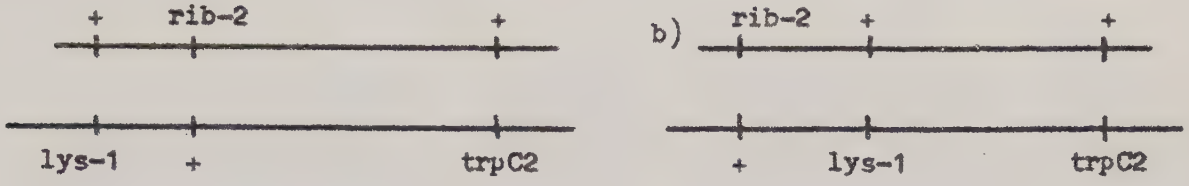
Souche réceptrice (génotype)	clones transduits			Ordre proposé
	marqueur sélectif	classes	nombre	
	his-2$^+$	his-2$^+$ aro-2 lys-1$^+$	0	lys-1 aro-2 his-2
		his-2$^+$ aro-2$^+$ lys-1	219	
		his-2$^+$ aro-2$^+$ lys-1$^+$	347	
		his-2$^+$ aro-2 lys-1	18	

- La souche donatrice est de type sauvage.

TABLEAU XV : Transduction par PBS1. Croisements à trois facteurs en répulsion dans la région lys-1 metB3.

Souche réceptrice (génotype)	souche donatrice (génotype)	clones transduits			Ordre proposé
		marqueur sélectif	classes	nombre	
metB3 his-2	trpC2	metB3$^+$	metB3$^+$ his-2$^+$ trpC2	262	
			metB3$^+$ his-2$^+$ trpC2$^+$	16	trpC2 his-2 metB3
			metB3$^+$ his-2 trpC2	3	
			metB3$^+$ his-2 trpC2$^+$	238	
		his-2$^+$	his-2$^+$ trpC2$^+$ metB3	7	
			his-2$^+$ trpC2$^+$ metB3$^+$	5	trpC2 his-2 metB3
			his-2$^+$ trpC2 metB3	98	
			his-2$^+$ trpC2 metB3$^+$	105	
lys-1 his-2	trpC2	lys-1$^+$	lys-1$^+$ his-2$^+$ trpC2	165	
			lys-1$^+$ his-2$^+$ trpC2$^+$	8	lys-1 trpC2 his-2
			lys-1$^+$ his-2 trpC2	27	
			lys-1$^+$ his-2 trpC2$^+$	107	

lys-1 rib-2 ser-1. Nous n'avons jamais observé de cotransfert, même faible, avec le marqueur trpC2 en transformation. Nous avons effectué des croisements à trois facteurs avec deux marqueurs dans la souche réceptrice et le troisième dans la souche donatrice. Considérons par exemple le croisement dans lequel la souche réceptrice est lys-1 trpC2 la souche donatrice rib-2



Les résultats de ces croisements sont présentés dans le Tableau XVI. Nous avons appliqué le même raisonnement que celui présenté plus haut. La classe nécessitant un quadruple événement, donc la plus faible, sera si l'ordre est celui représenté en a) lys-1$^+$ rib-2$^+$ trpC2$^+$, si l'ordre est b) lys-1 rib-2 trpC2$^+$. En sélectionnant les clones trpC2$^+$ la comparaison de ces deux classes est possible : 18 clones sont prototrophes, 29 mutants lys-1 rib-2. Ceci semble être en faveur de l'ordre lys-1 rib-2 trpC2. En sélectionnant les clones lys$^+$ la classe prototrophe qui nécessite quatre événements sera beaucoup plus faible que la classe lys-1$^+$ rib2$^+$ trpC2 si l'ordre est celui représenté en a) ; par contre si l'ordre est celui indiqué en b) ces deux classes seront peu différentes la fréquence de recombinaison entre lys-1 et trpC2 étant de 35 %. Le Tableau XVI montre que 4 clones seulement sont du type lys-1$^+$ rib-2$^+$ trpC2$^+$ alors que 33 sont du type lys-1$^+$ rib-2$^+$ trpC2. L'ordre proposé est donc lys-1 rib-2 trpC2. Le même raisonnement a été tenu pour les autres croisements.Dans le cas où les marqueurs sont lys-1, rib-2 ser-1 deux configurations seulement sont possibles, soit lys-1 rib-2 ser-1 soit rib-2 lys-1 ser-1 puisque la fréquence de recombinaison entre lys-1 et rib-2 est faible par comparaison à celle entre lys-1 et ser-1 d'une part rib-2 et ser-1 d'autre part. D'après l'ensemble de ces résultats l'ordre proposé est le suivant :

lys-1 rib-2 ser-1 trpC2

TABLEAU XVI : Transduction par PBS1. Croisements à 3 facteurs en répulsion dans la région lys-1 trpC2.

Souche réceptrice (génotype)	Souche donatrice (génotype)	Clones transduits			nombre	Ordre proposé
		marqueur sélectif	échantillon	classes		
trpC2 lys-1	rib-2	trpC2$^+$	415	trpC2$^+$ rib-2$^+$ lys-1$^+$	18	
				trpC2$^+$ rib-2 lys-1	29	lys-1 rib-2 trpC2
		lys-1$^+$	483	lys-1$^+$ rib-2$^+$ trpC2$^+$	4	
				lys-1$^+$ rib-2$^+$ trpC2	33	
trpC2 ser-1	rib-2	trpC2$^+$	44	trpC2$^+$ rib-2$^+$ ser-1$^+$	7	
				trpC2$^+$ rib-2 ser-1	0	rib-2 ser-1 trpC2
		ser-1$^+$	276	ser-1$^+$ rib-2$^+$ trpC2$^+$	20	
				ser-1$^+$ rib-2$^+$ trpC2	12	
lys-1 ser-1	rib-2	ser-1$^+$	678	ser-1$^+$ rib-2$^+$ lys-1$^+$	28	
				ser-1$^+$ rib-2 lys-1	175	lys-1 rib-2 ser-1
		lys-1$^+$	719	lys-1$^+$ rib-2$^+$ ser-1$^+$	25	
				lys-1$^+$ rib-2$^+$ ser-1	39	

Les croisements dont nous venons d'exposer les résultats présentent des difficultés particulièrement à cause de la sensibilité de B.subtilis 168M à la L-sérine. Cette inhibition est levée par certains acides aminés, l'isoleucine, l'acide glutamique et surtout la thréonine, aussi nous avons étalé les cultures sur des boites contenant outre la sérine un mélange de ces trois acides aminés.

L'ordre des marqueurs sur le second fragments de chromosome étudié par transduction a été également confirmé par des croisements à trois facteurs (Tableau XVII). Il n'est pas nécessaire de décrire dans le détail ces expériences dont le principe est le même que celui mentionné plus haut.

L'ensemble des résultats obtenus par transduction nous permet d'établir la carte génétique de deux régions du chromosome de B.subtilis de taille relativement importante (Fig. 5 et 6).

II - Comparaison des fréquences de recombinaison au cours de la transformation et de la transduction.

1. Analyse de croisements à trois facteurs dans la région try par les deux méthodes.

Nous avons déjà signalé que pour un couple de marqueurs défini la fréquence de recombinaison est très différente selon qu'elle est déterminée en transformation ou en transduction, par l'intermédiaire de PBS1. Les valeurs obtenues par transduction sont beaucoup plus faibles. Ceci pourrait être dû au simple fait que les fragments d'ADN bactérien transférés par PBS1 sont de grande taille comparés aux segments d'ADN transformant. Les résultats génétiques indiquent qu'ils sont au moins trois fois plus grands. Cependant si la distance physique entre deux mutations devient très petite vis à vis de la longueur du segment d'ADN transformant on doit s'attendre à ce que les différences observées diminuent lorsqu'on considère

TABLEAU XVII : Transduction par PBS1. Croisements à 3 facteurs dans la région leu-1 nic-38

Souche réceptrice (génotype)	Souche donatrice (génotype)	Clones transduits			Ordre proposé
		marqueur sélectif	classes	nombre	
ilvC1 phe-2 nic-38	WT	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ phe-2 nic-38$^+$	0	
			ilvC1$^+$ phe-2 nic-38	72	
			ilvC1$^+$ phe-2$^+$ nic-38$^+$	150	ilvC1 phe-2 nic-38
			ilvC1$^+$ phe-2$^+$ nic-38	4	
		nic-38$^+$	nic-38$^+$ phe-2 ilvC1$^+$	1	
			nic-38$^+$ phe-2 ilvC1	35	
			nic-38$^+$ phe-2$^+$ ilvC1$^+$	316	ilvC1 phe-2 nic-38
			nic-38$^+$ phe-2$^+$ ilvC1	84	
		phe-2$^+$	phe-2$^+$ nic-38 ilvC1$^+$	11	
			phe-2$^+$ nic-38 ilvC1	9	
			phe-2$^+$ nic-38$^+$ ilvC1$^+$	312	ilvC1 phe-2 nic-38
			phe-2$^+$ nic-38$^+$ ilvC1	110	
phe-1 leu-1	ilvC1	phe-1$^+$	phe-1$^+$ ilvC1 leu-1$^+$	180	
			phe-1$^+$ ilvC1 leu-1	21	
			phe-1$^+$ ilvC1$^+$ leu-1$^+$	4	leu-1 ilvC1 phe-1
			phe-1$^+$ ilvC1$^+$ leu-1	81	
		leu-1$^+$	leu-1$^+$ ilvC1 phe-1$^+$	160	
			leu-1$^+$ ilvC1 phe-1	89	
			leu-1$^+$ ilvC1$^+$ phe-1$^+$	5	leu-1 ilvC1 phe-1
			leu-1$^+$ ilvC1$^+$ phe-1	9	

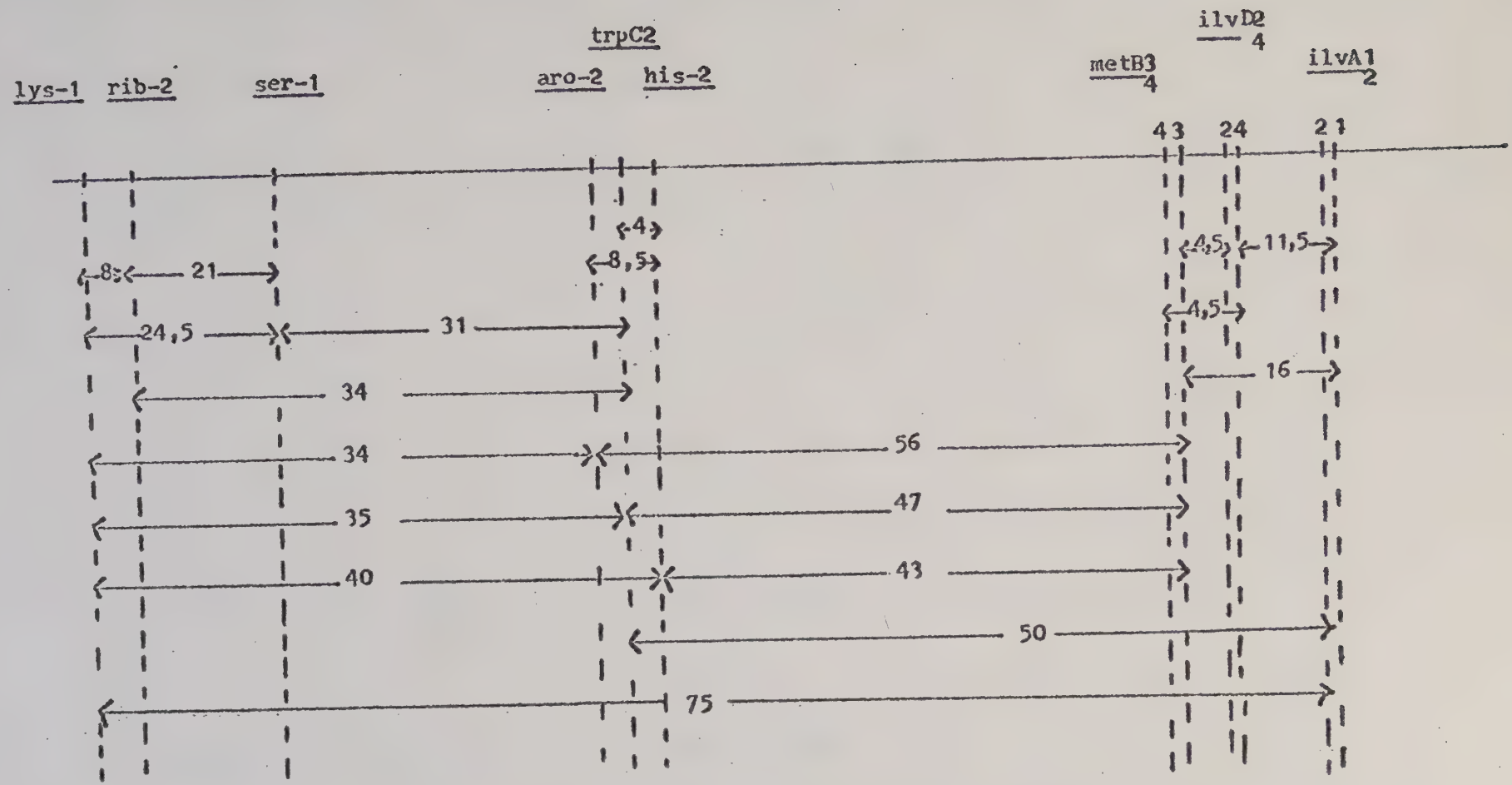


Fig. 5 : Carte génétique de la région lys ilvA

Les nombres indiqués représentent les pourcentages de recombinaison (la moyenne de plusieurs expériences).

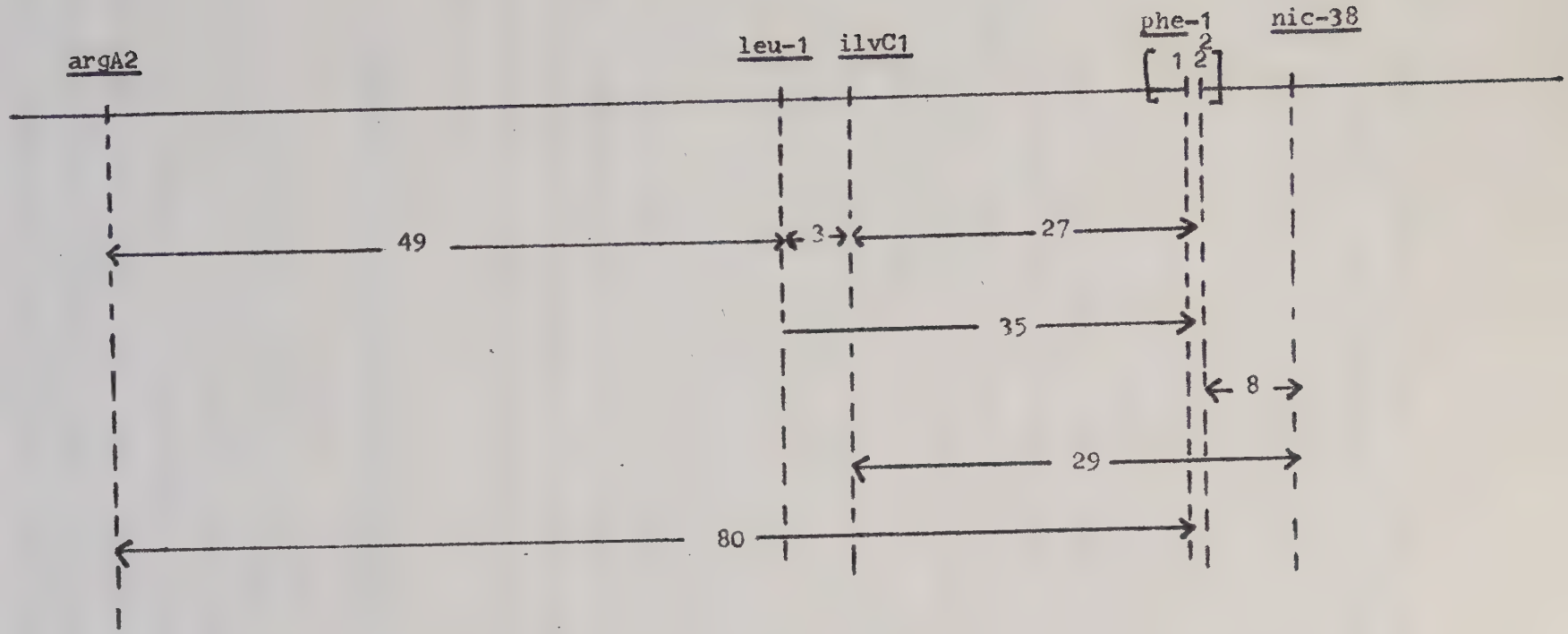


Fig. 6 : carte génétique de la région argA - nic38

- Les nombres indiqués représentent les pourcentages de recombinaison (la moyenne de plusieurs expériences).
- [ ] signifie que l'ordre n'a pas été déterminé.

des couples de marqueurs de plus en plus fortement liés. Les résultats des croisements à deux facteurs dont les fréquences de recombinaison sont données dans le Tableau IX montrent une diminution relativement faible et de ce fait ne sont pas en faveur de l'hypothèse énoncée plus haut.

Néanmoins cette hypothèse ne peut pas être écartée, aussi dans le but d'apporter plus de renseignements sur ce point nous avons comparé les résultats obtenus dans le cas de croisements à trois facteurs par l'une et l'autre méthode d'analyse. En effet si l'appariement entre l'ADN exogène et le génome de la souche réceptrice est discontinu on pourrait supposer qu'il existe une distance plus grande entre les zones d'appariement quand les fragments d'ADN sont plus longs. Si on considère, dans une expérience de transduction, des marqueurs situés sur le même fragment d'ADN transformant, c'est à dire une région petite par rapport à la longueur totale du segment transduit on pourrait s'attendre à ce que la classe de clones transduits nécessitant quatre événements de recombinaison soit pratiquement inexistante. Le Tableau XVIII semble bien en faveur d'une telle hypothèse, encore faut-il que le postulat concernant l'appariement que nous avons posé puisse être vérifié. Il faut remarquer aussi qu'on pourrait expliquer les mêmes résultats en faisant l'hypothèse que la recombinaison a lieu par des mécanismes différents au cours de la transformation et de la transduction par PBS1.

2. Transformation par l'ADN extrait à partir des particules du phage PBS1.

Une autre hypothèse serait que l'ADN bactérien injecté par le bactériophage ait subi des modifications de nature à influencer le processus de la recombinaison. Dans ce but nous avons étudié le degré de liaison entre deux marqueurs par transformation à l'aide d'ADN extrait à partir des particules de PBS1. Cette solution d'ADN est en fait un mélange d'ADN de PBS1 et d'ADN bactérien transféré par le phage. Nous avons choisi la souche ilvA2 metB3 comme réceptrice ; la fréquence de recombinaison entre

TABLEAU XVIII : Etude comparative d'un croisement à trois facteurs en transformation et transduction par le bactériophage PBS1 (souche réceptrice trpE8 trpC2 his-2)

Classes	Effectif	
	en transformation	en transduction
his-2$^+$ trpC2$^+$ trpE8$^+$	124	2.276
his-2$^+$ trpC2 trpE8$^+$	10	1
his-2$^+$ trpC2 trpE8	116	38
his-2$^+$ trpC2$^+$ trpE8	85	13
Total :	335	2.328

- L'ADN de type sauvage a été employé à une concentration de 0,007µg/ml

- La distinction entre les clones trpE8$^+$ trpC2 et trpE8 trpC2 a été faite en mesurant la fluorescence de la classe trpE8+ trpC2 lorsque les cellules sont cultivées en présence de tryptophane limitant.

ces deux marqueurs est de 4,5 % en transduction par PBS1 et de 39 % en transformation. Une même culture compétente a été transformée d'une part par de l'ADN extrait à partir des particules de PBS1, d'autre part par l'ADN extrait à partir de la souche WT de B.subtilis. Le Tableau XIX montre clairement que la fréquence de recombinaison est la même dans l'un et l'autre cas. Les différences observées entre le degré de liaison mesuré par transformation et celui mesuré par transduction pour un même couple de marqueurs ne peuvent donc pas être imputées à des modifications subies par l'ADN bactérien lors de son transfert par PBS1.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

La transduction par le bactériophage PBS1 nous a permis de confirmer certaines relations de liaisons suggérées en transformation pour lesquelles des doutes pouvaient subsister à cause de la faible fréquence de cotransfert. Il est donc établi que dans nos préparations d'ADN il existe des segments très longs capable d'opérer une transformation sur des longueurs importantes du chromosome.

D'autre part, nous avons mis en évidence deux différences importantes entre transformation et transduction par PBS1 :

1. Les particules transductrices de PBS1 transfèrent des fragments d'ADN qui sont beaucoup plus longs que les segments d'ADN transformant.

2. La valeur du taux de recombinaison entre deux marqueurs est beaucoup plus faible en transduction qu'en transformation.

Nous allons considérer successivement ces deux points :

- 1) Non seulement des mutations très faiblement liées en transformation sont cotransférées avec un forte fréquence, mais encore de nouvelles relations de liaison ont pu être observées. TAKAHASHI (63) a également montré une liaison par transduction, entre des marqueurs de sporulation

TABLEAU XIX : Transformation par de l'ADN extrait à partir des particules du phage PBS1 (souche réceptrice : ilvD2 metB3)

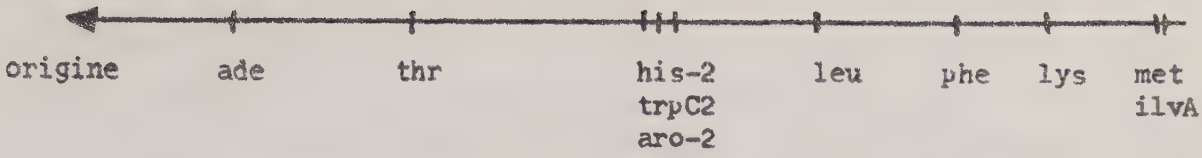
Origine de l'ADN	marqueur sélectif	échantillon	Clones transformés		Recombinaison %
			classes	effectif	
particules PBS1[a]	ilvD2$^+$	56	ilvD2$^+$ metB3$^+$	26	53,5
			ilvD2$^+$ metB3	30	
	metB3$^+$	46	metB3$^+$ ilvD2$^+$	26	43,5
			metB3$^+$ ilvD2	20	
B.Subtilis[b]	ilvD2$^+$	118	ilvD2$^+$ metB3$^+$	62	47,5
			ilvD2$^+$ metB3	56	
	metB3$^+$	133	metB3$^+$ ilvD2$^+$	72	45,8
			metB3$^+$ ilvD2	61	

a. Le bactériophage PBS1 a été propagé sur une souche de type sauvage.

b. La souche donatrice est de type sauvage. La concentration en ADN est limitante.

et des marqueurs de résistance aux antibiotiques, qui n'avait pas été soupçonnée par transformation. Il n'est pas douteux que le cotransfert de deux mutations implique qu'elles soient situées sur un même fragment d'ADN. En effet les résultats des croisements à deux et trois facteurs nous permettent de proposer un ordre linéaire pour les différents marqueurs les uns par rapport aux autres. Les mutations ilvA, trpC, lys situées chacune sur un segment d'ADN transformant différent sont transférées simultanément : ces trois segments se trouvent ainsi juxtaposés dans un ordre défini. D'autre part, comme nous l'avons déjà signalé, KELLY et PRITCHARD (39) ont mis en évidence une relation de liaison entre ilvA et trpC2, ainsi qu'entre rib et trpC2 par des expériences de transformation. La carte de la région ilvA - lys qu'ils ont proposé est comparable à la nôtre, cependant il ne leur est pas possible de préciser le sens dans lequel sont situés les segments d'ADN transformant les uns par rapport aux autres. Les croisements à trois facteurs que nous avons réalisés par transduction résolvent ce problème aussi pouvons nous établir une carte relativement détaillée de cette région du chromosome. Nous avons également étudié un second fragment du génome sur lequel sont situés les gènes argA, leu, ilvC, phe, nic (la liaison phe - nic avait été mise en évidence par DUBNAU et ses collaborateurs. (16).

YOSHIKAWA et SUEOKA (72) ont proposé une carte du génôme de B.subtilis en se basant sur l'hypothèse de la synthèse orientée du chromosome. Ils comparent les fréquences de transformation relatives de plusieurs marqueurs, l'ADN étant extrait à partir d'une culture en phase exponentielle à différents temps et à partir d'une culture en phase stationnaire. Les différences obtenues correspondraient, d'après leur théorie, à la différence du nombre de copies des marqueurs dans l'ADN ce qui reflète leur position sur le chromosome. La carte qu'ils proposent est la suivante :



OISHI, YOSHIKAWA et SUEOKA (51) ont par la suite obtenu une carte identique par une méthode différente, celle du "transfert de densité". Ils extraient l'ADN pendant la première génération de la germination de spores formées en milieu contenant du deuterium, le milieu de la germination étant "léger". Après centrifugation dans un gradient de chlorure de cesium ils étudient le passage des différents marqueurs d'une position correspondant à un ADN "lourd" à celle d'ADN hybride puis léger. Les résultats de SUEOKA et ses collaborateurs sont en désaccord avec ceux que nous avons obtenus en transduction en ce qui concerne la position des marqueurs du segment tryptophane. Deux hypothèses peuvent rendre compte de cette différence : soit les souches utilisées par ces auteurs et les nôtres diffèrent par une translocation, soit il existe plus d'un chromosome chez B.subtilis. Nous avons pu écarter la première hypothèse en effectuant des expériences de transduction avec les souches utilisées par SUEOKA. Nous avons de nouveau observé que les marqueurs de la région try étaient liés à ilvA et met et n'étaient pas liés à leu. DUBNAU, GOLDTHWAITE, SMITH et MARMUR (16), en utilisant conjointement les deux méthodes, transfert de densité et transduction par PBS1 ont publié une carte du chromosome de B.subtilis qui corrobore l'ordre que nous avons proposé. O'SULLIVAN et SUEOKA (54) en effectuant de nouvelles expériences de transfert de densité ont trouvé par la suite que le segment lys - trpC2 - metB - ilvA se situe dans la région terminale du chromosome. Il en résulte que la transduction par le bactériophage PBS1 permet d'établir avec une précision suffisante des cartes génétiques de régions du chromosome de B.subtilis relativement étendues.

- 2) La fréquence de recombinaison entre deux marqueurs est beaucoup plus faible lorsqu'elle est mesurée par transduction à l'aide du bactériophage PBS1 que par transformation. CSIZAR et IVANOVICS (14) ont étudié la transduction de B.subtilis par le phage 3NT apparenté sérologiquement à PBS1, ils ont déterminé la fréquence de recombinaison entre trpC2 et his-2 ; elle est du même ordre que celle que nous avons obtenue avec PBS1.

Cette différence n'est pas dûe à une modification qu'aurait subie l'ADN bactérien transféré par le bactériophage puisque la valeur du taux de recombinaison entre deux marqueurs, déterminée par transformation, est la même, que l'ADN soit extrait à partir des particules transductrices ou à partir d'une culture de B.subtilis. La seconde hypothèse qu'on peut invoquer est que ce phénomène est dû à la différence de longueur des segments d'ADN transférés dans l'un et l'autre cas. D'après nos résultats les fragments d'ADN transducteurs seraient d'une taille au moins trois à quatre fois supérieure à celle des segments d'ADN transformant. DUBNAU et ses collaborateurs (16) ont comparé la distance maximale entre deux marqueurs cotransférés par PBS1 (évaluée comme le cotransfert le plus faible observé) à la longueur totale approximative du génome de B.subtilis. Ils estiment, d'après ces calculs, que les fragments d'ADN transférés par PBS1 devraient avoir un poids moléculaire de l'ordre de 3.10^8. YAMAGISHI (70) a récemment mesuré le poids moléculaire de l'ADN extrait à partir des particules transductrices de PBS1. Il serait compris entre 4.10^6 et $1,3.10^8$ (Selon cet auteur seul du DNA bactérien serait incorporé dans les particules transductrices). On peut se demander si la seule différence de taille des fragments transférés peut rendre compte de la différence observée entre les valeurs des taux de recombinaison. Ces différences atteignent quelquefois un facteur 10. Chez E.coli la fréquence de recombinaison entre deux mutations mesurée au cours de la transduction par P1 et au cours de la conjugaison n'est pas la même. La différence n'est cependant pas très importante (2 à 3 fois) bien que la taille des segments d'ADN soit très dissemblable. En effet au cours de la conjugaison des fragments très longs du chromosome sont introduits dans la cellule réceptrice. D'autre part, VERHOEF (68) a montré que dans un croisement à 4 facteurs en couplage, lorsqu'on sélectionne les deux marqueurs les plus distants la probabilité qu'un événement de recombinaison ait lieu entre deux marqueurs intermédiaires est la même, que l'ADN ait été transféré par transduction ou conjugaison. Dans les suspensions de bacétriophages P1 certaines particules (environ 25 %) sont plus petites (36). Les fragments d'ADN qu'elles contiennent, qu'ils soient

d'origine bactérienne (particules transductrices) ou qu'ils soient une partie du génome du bactériophage, correspondent à environ 40 % de ceux contenus dans les particules normales. Lorsque la transduction est effectuée par l'intermédiaire des petites particules certaines relations de liaison sont perdues ; le cotransfert de marqueurs plus proches est diminué mais peu. Dans ces deux exemples les différences observées sont très faibles comparées à celles qui existent entre la transformation et la transduction par PBS1, bien que les différences de taille des segments d'ADN transférés soient importantes.

Il est finalement très difficile de conclure, aucun fait tangible ne nous permet de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle les différences entre les fréquences de recombinaison mesurées par transformation et transduction seraient dûes à la différence de taille des segments d'ADN transférés. On peut avancer une autre hypothèse : les processus de recombinaison opérant au cours de la transformation et de la transduction par PBS1 ne sont pas les mêmes. Les résultats des croisements à trois facteurs (Tableau XVIII) qui n'excluaient pas l'hypothèse précédente ne sont pas non plus contraires à celle-ci.

CHAPITRE IV

DIFFERENCES DANS LA RECOMBINAISON ENTRE TRANSFORMATION ET TRANSDUCTION PAR PBS1 - PROPRIETES DES MUTANTS DEFECTIFS POUR LA RECOMBINAISON

Le mécanisme de la recombinaison au niveau moléculaire n'est pas encore connu, cependant au cours de ces dernières années de nombreuses informations ont été apportées sur ce sujet. Il a été montré chez différents organismes que la recombinaison se fait par cassure et réunion des segments d'ADN. Selon MESELSON (47) la formation d'un bactériophage de type recombiné est le résultat de la cassure suivie de la réunion de deux molécules d'ADN bicaténaires préexistantes. Chez les bactéries, le transfert d'un caractère génétique par transformation est dû à l'intégration d'un fragment d'ADN exogène, sous forme monocaténaire, dans le génôme de la bactérie réceptrice et ceci très rapidement après la pénétration de l'ADN exogène dans la cellule hôte (7-24-41-42).

Le mécanisme de la recombinaison génétique peut être rapproché du mécanisme de la réparation des lésions produites dans l'ADN par les rayons ultraviolets, les rayons X ou certains agents chimiques comme la mitomycine C. La mortalité des bactéries après irradiation par les UV est dûe principalement à la formation de photoproduits dans l'ADN dont les plus importants sont les dimères de pyrimidines (58-59). Normalement la cellule irradiée est capable de réparer de telles lésions. Les dimères de pyrimidines sont excisés au sein de petits oligonucléotides. L'interruption de la chaine d'ADN provoquée par cette excision est suivie d'une dégradation partielle de l'ADN puis d'une synthèse de réparation et enfin de la réunion des extrémités libres (6-10-55-57).

L'existence d'une certaine relation entre ces deux processus, recombinaison génétique et réparation des lésions après irradiation, a été renforcée par la découverte de mutants d'E.coli plus sensibles que les souches sauvages aux rayons ultraviolets et affectés dans la recombinaison (12).

Si la recombinaison n'est pas effectuée par le même mécanisme au cours de la transformation et de la transduction par le bactériophage PBS1, l'étude de mutants affectés dans le processus de la recombinaison pourrait éventuellement nous permettre de mettre en évidence les différences existant entre ces deux mécanismes.

Une étude de mutants de B.subtilis plus sensibles que la souche sauvage aux radiations ultraviolettes a été entreprise dans ce laboratoire. Le comportement de souches portant trois de ces mutations recA1, recB2, uvr-1 au cours de la transformation et de la transduction a été précisé (12). Dans le cadre de ce travail nous avons étudié l'effet de ces mutations sur la transduction par le phage PBS1.

Par la suite nous avons isolé de nouveaux mutants sensibles aux rayons UV. - marqueurs recB3 et rec-4 - et étudié leurs propriétés. Notre étude a porté également sur certaines autres propriétés de tous les mutants sensibles aux UV., comme par exemple leur aptitude à absorber l'ADN transformant, la dégradation et la synthèse de l'ADN cellulaire après irradiation dans l'ultraviolet. L'ensemble de ces recherches a permis de mettre en évidence certaines différences importantes dans le comportement des souches en transformation et en transduction par PBS1 ainsi que d'apporter des précisions sur les fonctions gouvernées par les différents loci impliqués dans la réparation des lésions provoquées par les rayons ultraviolets.

RESULTATS

1 - Transformation et transduction par le bactériophage SP10 des souches portant les marqueurs recA1, recB2 ou uvr-1.

Les souches qui portent les mutations recA1, recB2 ou uvr-1 présentent

une sensibilité accrue aux radiations ultraviolettes et à la mitomycine C. Leur fréquence de transformation et de transduction par le phage SP10 a été déterminée comparativement à la souche parentale (Tableau XX). La mutation uvr-1 ne diminue ni la fréquence de la transformation, ni celle de la transduction par ce phage. La fréquence de transformation résiduelle des souches recA1 et recB2 est respectivement de 5 % et 25 %. La diminution de la fréquence de transduction est du même ordre que celle observée en transformation pour les deux marqueurs. La fréquence de recombinaison entre marqueurs liés n'est pas modifiée par la présence de la mutation recB2 par contre elle est réduite chez les souches qui portent le marqueur recA1. Les caractères, sensibilité aux rayons ultraviolets, à la mitomycine C et la réduction de la fréquence de transformation et transduction sont dus à une seule mutation.

2 - Transduction par PBS1 des souches qui portent les mutations recA1, recB2 ou uvr-1.

Si le mécanisme de la recombinaison utilisé au cours de la transduction par le phage PBS1 n'est pas différent de celui qui opère au cours de la transformation, on doit s'attendre à ce que les mutations de sensibilité à l'ultraviolet aient un effet analogue dans l'un et l'autre cas. Les résultats sont indiqués dans le Tableau XXI. La mutation uvr-1 n'affecte pas la transduction par PBS1, la fréquence observée est même souvent supérieure à celle de la souche parentale. Alors que la présence de la mutation recA1 abaisse considérablement la fréquence de transformation ou transduction par SP 10 (fréquence résiduelle 1 à 8 %), elle n'a aucun effet sur la fréquence de transduction par PBS1. Chez les souches recB2, cette fréquence est réduite. La transduction par le phage 3NT, apparenté sérologiquement à PBS1, est affectée par les trois mutations recA1, recB2 et uvr-1 d'une façon analogue (29). La fréquence de recombinaison entre marqueurs liés, déterminée par transduction à l'aide de PBS1 n'est modifiée par aucune de ces trois mutations (Tableau XXII).

TABLEAU XX : Transformation et transduction par le phage SP10 des souches possédant les marqueurs recA1, recB2 et uvr-1.

Marqueur rec (ou uvr) de la souche réceptrice	marqueur sélectif	Fréquence relative(1)	
		transformation	transduction
rec^+	$trpC2^+$	100	100
rec^+	$metB4^+$	100	100
recA1	$trpC2^+$	2	1
recA1	$metB4^+$	2	6
recB2	$trpC2^+$	31	24
recB2	$metB4^+$	22	23
uvr-1	$trpC2^+$	101	180
uvr-1	$metB4^+$	94	230

(1)
calculée en pourcentage de la fréquence de transformation (ou transduction) de la souche parentale (rec^+)

Résumé d'après HOCH, BARAT et ANAGNOSTOPOULOS (29).

TABLEAU XXI : Transduction par PBS1 des souches recA1 - recB2 et uvr-1

Souches	lysat	marqueur sélectif trpC2$^+$		marqueur sélectif metB4$^+$	
		fréquence de la transduction	% par rapport à la parentale	fréquence de la transduction	% par rapport à la parentale
1026	A	$1,7.10^{-6}$	100	$1,4.10^{-6}$	100
(rec$^+$)	B	$7,2.10^{-6}$		$5,8.10^{-6}$	
	B	$4,9.10^{-6}$	100	$5,8.10^{-6}$	100
1025	B	$1,0.10^{-5}$		$9,0.10^{-6}$	
(recA1)	B	$2,5.10^{-6}$	93	$4,2.10^{-6}$	101
	B	$4,5.10^{-6}$		$4,5.10^{-6}$	
1028	B	$4,7.10^{-6}$		$4,2.10^{-6}$	
(recB2)	B	$2,2.10^{-6}$	53	$1,9.10^{-6}$	50
	B	$2,7.10^{-6}$		$2,7.10^{-6}$	
1027	A	$1,9.10^{-6}$	112	$1,4.10^{-6}$	100
(uvr-1)	B	$1,4.10^{-5}$	230	$1,1.10^{-5}$	189

TABLEAU XXII : Transduction par PBS1 : fréquence de la recombinaison entre marqueurs liés chez les souches rec$^+$ et rec$^-$

Souches	marqueur sélectif	Recombinaison %	marqueur sélectif	Recombinaison %
1026 rec$^+$ trpC2 metB4	trpC2$^+$	46	metB4$^+$	44
1025 recA1 "	"	52	"	46
1028 recB2 "	"	48	"	50
1027 uvr-1 "	"	50	"	42

3 - Propriétés des souches qui portent les marqueurs recB3 et rec-4

Les souches originales portant les mutations recB3 et rec-4 ont été obtenues par action sur la souche 168M, des rayons ultraviolets (recB3) ou de la N méthyl N' nitro N nitrosoguanidine (rec-4). Ces marqueurs ont été ensuite introduits par transformation dans des mutants qui ont des marqueurs d'auxotrophie. On obtient ainsi des souches qui, à part le caractère de sensibilité à l'ultraviolet sont isogéniques pour le reste du génome. Les mutants auxotrophes utilisés comme recepteurs constituent les souches parentales. Le génotype et l'obtention de ces souches sont mentionnés dans le Tableau I (Chapitre I).

a - Sensibilité aux rayons ultraviolets et à la mitomycine C.

La sensibilité aux rayons U.V. des souches qui portent les marqueurs recB3 et rec-4 a été comparée à celle de la souche parentale et à celle des mutants précédemment étudiés (Fig. 7). L'inactivation des souches recB3 est du même ordre que celle obtenue pour les mutants recA1 et recB2, par contre les souches rec-4 sont beaucoup plus sensibles. La sensibilité à la mitomycine C des souches recB3 est comparable à celle des souches recA1 et recB2, celle des souches rec-4 est plus élevée (Tableau XXIII).

b - Transformation.

La fréquence de transformation des souches qui portent la mutation recB3 est assez variable mais reste toujours inférieure à celle de la souche parentale 10 à 50 % (Tableau XXIV). Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons jamais pu observer de transformation chez les souches rec-4. Nous avons employé deux méthodes pour le développement de l'état de compétence, celle usuelle dans notre laboratoire (voir Chap. I) et celle préconisée par WILSON et BOTT (9-69). Selon cette dernière méthode la compétence est maximale, trois heures après la fin de la phase exponentielle. L'apparition de ce pic de compétence est très reproductible et indépendante de la vitesse de croissance de la souche. Quelque soit le marqueur d'auxotrophie étudié

TABLEAU XXIII : Sensibilité à la mitomycine C (M.C.) des souches recB3 et rec-4

Souches / M.C. µg/ml	rec$^+$	recB3	rec-4
0,100	-	-	-
0,050	+	-	-
0,035	+	-	-
0,025	+	-	-
0,020	+	-	-
0,015	+	-	-
0,010	+	+	-
0,005	+	+	+

La sensibilité à la mitomycine C a été déterminée par étalements et par répliques sur milieu TBAB additionné des différentes concentrations d'antibiotique.

Figure 7 : Sensibilité aux rayons ultraviolets des souches *rec*$^+$, *rec* et *uvr*.

Les bactéries en phase exponentielle sont mises en suspension dans du milieu minimum à une densité de l'ordre de 10^8 cellules par ml. Elles sont irradiées à une intensité de 15 ergs/mm^2/sec. La viabilité est déterminée par étalements sur milieu complexe TBAB.

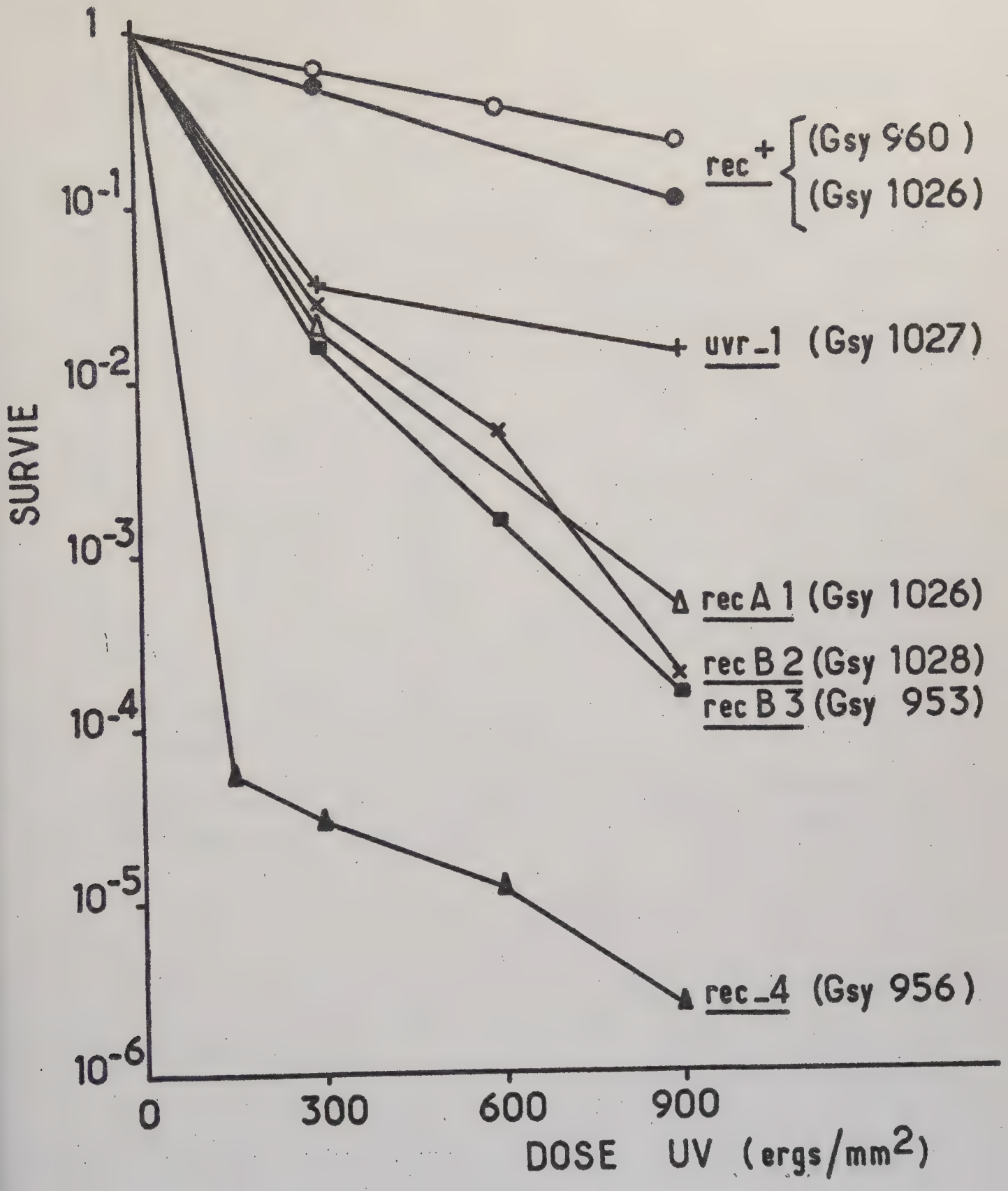

1
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
10^{-6}
SURVIE
0
300
600
900
DOSE UV (ergs/mm^2)
rec$^+$ (Gsy 960)
(Gsy 1026)
uvr_1 (Gsy 1027)
rec A 1 (Gsy 1026)
rec B 2 (Gsy 1028)
rec B 3 (Gsy 953)
rec_4 (Gsy 956)

TABLEAU XXIV : Transformation des souches qui portent le marqueur recB3

Souche réceptrice	marqueur sélectif	fréquence de la transformation (1)	% (2)
958 (rec$^+$)	ilvC1$^+$	$3{,}72.10^{-3}$	100
	nic-38$^+$	$5{,}40.10^{-3}$	100
953 (recB3)	ilvC1$^+$	$9{,}32.10^{-4}$	25
	nic-38$^+$	$1{,}75.10^{-3}$	32
SB25 (rec$^+$)	trpC2$^+$	$2{,}07.10^{-3}$	100
	his-2$^+$	$1{,}73.10^{-3}$	100
961 (recB3)	trpC2$^+$	$1{,}12.10^{-3}$	54
	his-2$^+$	$9{,}44.10^{-4}$	54

- La souche donatrice est de type sauvage.
- La concentration en ADN est saturante

(1) Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de 3 expériences

(2) Pourcentage de transformation par rapport à la souche parentale rec$^+$

la fréquence des clones prototrophes obtenus au cours de la transformation d'une souche qui porte le marqueur rec-4 par de l'ADN sauvage est du même ordre que la fréquence de mutation en retour du marqueur considéré. La présence de la mutation rec-4 semble donc abolir complètement la transformation.

La fréquence de recombinaison entre marqueurs liés n'est pas affectée par la mutation recB3 (Tableau XXV).

c - Transduction

SP10. La diminution de la fréquence de transduction par le phage SP10 est du même ordre que celle observée en transformation. La fréquence de transduction résiduelle est de 60 % pour les souches recB3 et nulle pour les souches rec-4 (Tableau XXVI). On observe chez ces mutants tout comme chez les souches recA1 et recB2 une bonne corrélation entre les résultats obtenus par transformation et ceux obtenus par transduction à l'aide du phage SP10.

PBS1. La mutation recB3 tout comme recB2 affecte la fréquence de transduction par PBS1, la diminution est relativement faible (Tableau XXVII). Aucune des souches portant la mutation rec-4 n'est transductible. Toutes sont cependant normalement flagellées (le bactériophage PBS1 s'adsorbe spécifiquement sur les flagelles (37)) et permettent la multiplication des bactériophages. L'absence de la transduction ne peut donc pas être imputée à une absence d'adsorption des particules de PBS1.

d - Etude des mutations en retour chez les souches recB3

L'obtention d'une mutation en retour pour l'un des caractères comme la résistance à la mitomycine C confère en même temps une résistance accrue aux rayons ultraviolets et une aptitude à la transformation et transduction comparable à celle de la souche parentale. Nous avons observé que la fréquence de mutation en retour du marqueur recB3 porté par la souche GSY955

TABLEAU XXV : Transformation : fréquence de la recombinaison entre marqueurs liés chez les souches recB3.

Souche réceptrice (génotype)	marqueur sélectif	Fréquence de la recombinaison %
trpC2 his-2	trpC2$^+$	39
	his-2$^+$	28
trpC2 his-2 recB3	trpC2$^+$	38
	his-2$^+$	25,5

- La souche donatrice est de type sauvage
- La concentration en ADN est limitante.

TABLEAU XXVI : Transduction par SP10 des souches recB3 et rec-4.

Souche	lysat	marqueur sélectif	fréquence de la transduction	% par rapport à la parentale
960	B	ilvC1$^+$	$5,9\ 10^{-6}$	
rec$^+$	B	"	$2,2\ 10^{-6}$	100
955	B	"	$2,6\ 10^{-6}$	
recB3	B	"	$2,2\ 10^{-6}$	60
956	B	"	0	
rec-4	B	"	0	0

TABLEAU XXVII : Transduction par PBS1 des souches recB3 et rec-4

Souches	lysat	marqueur sélectif	fréquence de la transduction	% par rapport à la parentale
960	C	ilvC1$^+$	3,6 10^{-6}	100
(rec$^+$)	C	"	2,8 10^{-6}	
955	C	"	2,9 10^{-6}	109
(recB3)	C	"	4,1 10^{-6}	
816	D	nic-38$^+$	4,2 10^{-6}	100
(rec$^+$)	D	"	4,9 10^{-6}	
953	D	"	4,7 10^{-6}	77
(recB3)	D	"	2,3 10^{-6}	
954	C	ilvC1$^+$(a)	0	0
(rec-4)	D	"	0	

- Le lysat transducteur est de type sauvage.

(a) - D'autres marqueurs ont été étudiés. Quelque soit le marqueur sélectionné la fréquence de transduction d'une souche rec-4 est nulle.

était particulièrement élevée $2,2.10^{-6}$/ml. Nous avons alors déterminé la fréquence de mutation en retour pour le caractère résistance à la mitomycine C de toutes les souches qui portaient le marqueur recB3 : dans tous les cas il est en moyenne de $2,5.10^{-8}$/ml. La souche GSY955 porte, outre la mutation recB3, la mutation ilvC1. Alors que le taux de mutation en retour de ce marqueur est habituellement de $1,3.10^{-8}$/ml (y compris dans les autres souches recB3) il est de $1,8.10^{-6}$/ml dans ce cas. Cette augmentation pourrait correspondre à l'apparition dans cette souche d'une mutation du type gène mutateur. Une relation entre la sensibilité aux U.V. et une instabilité génétique a été observée chez E.Coli (49), Proteus mirabilis (8) et Neisseria meningitidis (38) ; ces deux caractères ont été attribués à une même mutation. Les auteurs pensent que la réparation de modifications dans l'ADN qui conduiraient à de potentielles mutations spontanées et la réparation de lésions provoquées par les rayons ultraviolets pourraient être effectuées par le même mécanisme. D'un autre côté HILL a observé chez E.coli B/r (28) une instabilité générale qui est apparue spontanément dans une souche déjà sensible aux U.V. (parce qu'incapable d'exciser les dimères de pyrimidine formés après irradiation). Dans ce cas là, il ne semble pas y avoir corrélation étroite entre ces deux propriétés. Les résultats que nous avons obtenus avec la souche GSY 955 qui porte la mutation recB3 ressemblent plutôt à ceux obtenus par HILL (28).

e - Localisation du marqueur recB3

Les mutations recA1, recB2, uvr-1 ont été localisées sur le chromosome (J. HOCH, C. ANAGNOSTOPOULOS - manuscrit en préparation). Nous avons recherché si les marqueurs recB3 et rec-4 étaient situés dans les mêmes régions que les autres marqueurs de sensibilité aux U.V. La mutation recB3 est cotransférée, comme recB2, avec le marqueur nic-38 par transformation et transduction. Au cours de ce travail nous avons observé que la valeur du taux de recombinaison entre les marqueurs nic-38, phe-2 ou ilvC1 et la mutation recB3 est très différente selon que cette dernière est située sur l'ADN donateur ou le génome de la souche réceptrice (Tableaux XXVIII et XXIX). Ce phénomène s'observe aussi bien au cours de la

TABLEAU XXVIII : Localisation de la mutation recB3 par transduction par PBS1.

génotype de la souche réceptrice	génotype de la souche donatrice	marqueur sélectif	Clones transduits classes observées	Nombre	Recombinaison %
ilvC1 phe-2 nic-38 GSY 816	recB3	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ recB3$^+$	36	
			ilvC1$^+$ recB3	57	39
			ilvC1$^+$ nic-38$^+$	60	
			ilvC1$^+$ nic-38	33	35
			ilvC1$^+$ phe-2$^+$	62	
			ilvC1$^+$ phe-2	31	33
		nic-38$^+$	nic-38$^+$ recB3$^+$	13	
			nic-38$^+$ recB3	37	26
phe-2 ilvC1 GSY 959	recB3	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ recB3$^+$	22	
			ilvC1$^+$ recB3	28	44
		phe-2$^+$	phe-2$^+$ recB3$^+$	10	
			phe-2$^+$ recB3	40	20
ilvC1 nic-38 recB3 GSY 953	WT	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ recB3$^+$	125	
			ilvC1$^+$ recB3	11	8
		nic-38$^+$	nic-38$^+$ recB3$^+$	191	
			nic-38$^+$ recB3	14	7
			nic-38$^+$ ilvC1$^+$	53	48
			nic-38$^+$ ilvC1	49	

TABLEAU XXIX : Localisation de la mutation recB3 par transformation

Génotype de la souche réceptrice	génotype de la souche donatrice	marqueur sélectif	clones transformés classes observées	nombre	Recombinaison %
ilvC1 nic-38 phe-2 GSY 816	trpC2 recB3	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ recB3$^+$	89	
			ilvC1$^+$ recB3	0	100
			ilvC1$^+$ phe-2$^+$	7	
			ilvC1$^+$ phe-2	77	92
		nic-38$^+$	nic-38$^+$ recB3$^+$	96	
			nic-38$^+$ recB3	29	77
			nic-38$^+$ phe-2$^+$	56	
			nic-38$^+$ phe-2	40	42
		phe-2$^+$	phe-2$^+$ recB3$^+$	115	
			phe-2$^+$ recB3	28	80
			phe-2$^+$ nic-38$^+$	57	
			phe-2$^+$ nic-38	35	38
ilvC1 nic-38 recB3 GSY 953	WT	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ recB3$^+$	8	
			ilvC1$^+$ recB3	73	90
			ilvC1$^+$ nic-38$^+$	8	
			ilvC1$^+$ nic-38	75	90
		nic-38$^+$	nic-38$^+$ recB3$^+$	66	
			nic-38$^+$ recB3	20	23
			nic-38$^+$ ilvC1$^+$	2	
			nic-38$^+$ ilvC1	84	97

TABLEAU XXIX : Localisation de la mutation recB3 par transformation

Génotype de la souche réceptrice	génotype de la souche donatrice	marqueur sélectif	clones transformés classes observées	nombre	Recombinaison %
ilvC1 nic-38 phe-2 GSY 816	trpC2 recB3	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ recB3$^+$	89	
			ilvC1$^+$ recB3	0	100
			ilvC1$^+$ phe-2$^+$	7	
			ilvC1$^+$ phe-2	77	92
		nic-38$^+$	nic-38$^+$ recB3$^+$	96	
			nic-38$^+$ recB3	29	77
			nic-38$^+$ phe-2$^+$	56	
			nic-38$^+$ phe-2	40	42
		phe-2$^+$	phe-2$^+$ recB3$^+$	115	
			phe-2$^+$ recB3	28	80
			phe-2$^+$ nic-38$^+$	57	
			phe-2$^+$ nic-38	35	38
ilvC1 nic-38 recB3 GSY 953	WT	ilvC1$^+$	ilvC1$^+$ recB3$^+$	8	
			ilvC1$^+$ recB3	73	90
			ilvC1$^+$ nic-38$^+$	8	
			ilvC1$^+$ nic-38	75	90
		nic-38$^+$	nic-38$^+$ recB3$^+$	66	
			nic-38$^+$ recB3	20	23
			nic-38$^+$ ilvC1$^+$	2	
			nic-38$^+$ ilvC1	84	97

transformation que de la transduction par PBS1. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. 1) Un certain nombre de clones rec, donc sensibles à la mitomycine, sont perdus. 2) La fréquence relative de transformation et de transduction du marqueur recB3 est faible comparativement à celle des mutations nic38$^+$ et phe-2$^+$ et de ce fait la fréquence de recombinaison se trouve augmentée. Il est très difficile de vérifier cette hypothèse, la sensibilité aux U.V. ou à la mitomycine C évidemment ne peut pas être utilisée comme caractère sélectif. 3) Une autre hypothèse serait qu'il se forme des hétérozygotes partiels ce qui entraînerait une augmentation du nombre de clones prototrophes. Nous avons étudié la descendance de clones prototrophes issus d'un croisement dans lequel les mutations nic-38 et recB3 étaient en couplage. Les 10 clones examinés étaient purs.

La mutation rec-4 n'a pas pu être encore localisée.

4 - Réactivation par l'hôte des bactériophages irradiés.

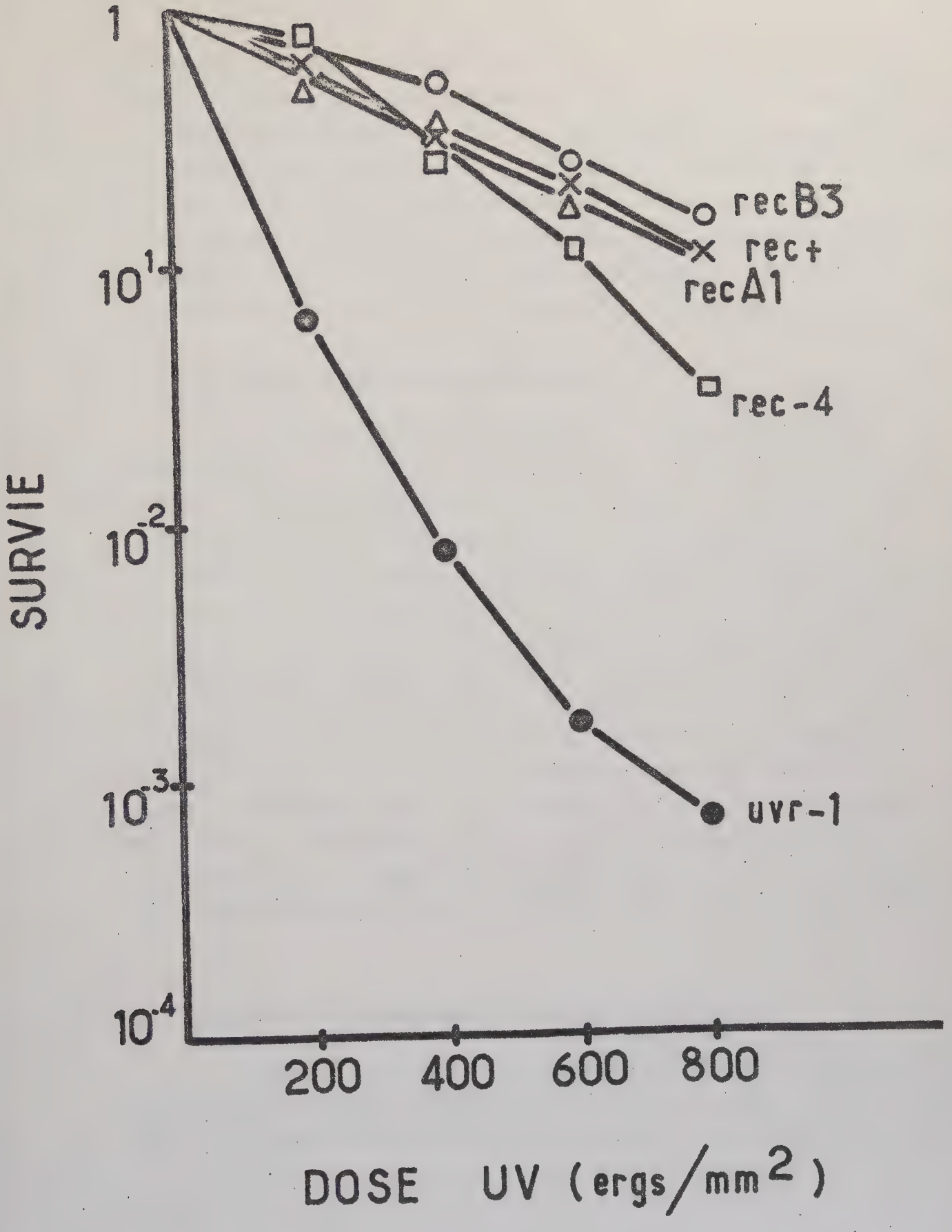
La survie des bactériophages après irradiation dépend généralement de la capacité de la cellule hôte à réparer les lésions provoquées par les U.V. dans le génôme du bactériophage (26). C'est pourquoi nous avons étudié la réactivation du bactériophage virulent SP01 (52), après irradiation, par les différents mutants sensibles aux rayons ultraviolets. D'après la figure 8 on voit que seules les souches uvr-1 ont perdu cette aptitude.

5 - Pénétration de l'ADN dans les souches rec$^+$ et rec.

Les différentes mutations de sensibilité à l'ultraviolet que nous avons étudiées affectent de la même façon la transformation et la transduction par SP10. Cette corrélation semble montrer que la diminution de la fréquence de la transformation n'est pas dûe à une absorption moindre de l'ADN par les cellules compétentes. Pour nous en assurer nous avons déterminé la fréquence de transformation par rapport à l'ADN donateur absorbé par la cellule.

Figure 8 : Réactivation par l'hôte des bactériophages irradiés.

Une suspension de phages SP01 (10^7 u/ml) dans du tampon Tris HCl 0,1 M pH 8,5 additionné de sulfate de magnésium 10^{-3} M est irradiée à une intensité de 10 ergs/mm^2/sec. Le nombre de centres infectieux produits sur les souches rec^+, rec et uvr est déterminé selon la technique qui utilise le milieu semi solide.


1
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
SURVIE
recB3
rec+
recA1
rec-4
uvr-1
200
400
600
800
DOSE UV (ergs/mm^2)

Le Tableau XXX montre que pour tous les mutants examinés elle reste inférieure à celle de la souche parentale (5 % chez recA1, 57 % chez recB3). La comparaison d'une souche rec-4 avec une souche non transformable (168 I^+NT) en raison de son incapacité à absorber l'ADN (71) permet d'affirmer que l'absence de transformation des souches rec-4 n'est pas due à une absence d'absorption de l'ADN dans les cellules. Ces résultats indiquent que la diminution de la fréquence de transformation ne peut pas être imputée à une déficience au niveau du développement de la compétence.

6 - Dégradation de l'ADN après irradiation.

Lorsqu'une cellule a été irradiée, la réparation des lésions s'accompagne d'une dégradation de l'ADN qui est supérieure à celle attendue s'il y avait seulement élimination des dimères de pyrimidine (57). Nous avons étudié cette dégradation chez les différents mutants. La croissance de chaque souche est effectuée en présence de thymidine tritiée afin de marquer l'ADN. Les cellules lavées sont irradiées et remises à incuber. La fraction de matériel radioactif devenu soluble dans l'acide trichloracétique à froid est mesurée. Après deux heures d'incubation la perte de radioactivité par la souche parentale, après une irradiation de 900 ergs/mm^2, est de 19 %, elle n'est que de 3 % chez la souche uvr-1 (Fig. 9). Pour une même dose UV la dégradation observée chez la souche recB2 est identique à celle de la parentale, celle de la souche recB3 est légérement inférieure. Par contre elle est nettement supérieure chez les souches recA1 et rec-4, 40 et 42 %. En absence d'irradiation aucune dégradation spontanée n'a été décelée comme chez certains mutants d'E.Coli (12 - 33).

7 - Incorporation de thymidine tritiée après irradiation.

L'irradiation d'une population bactérienne au cours de sa croissance entraine une inhibition temporaire de la synthèse de l'ADN. Chez les souches rec^+ celle-ci reprend normalement après un court temps de latence. Nous

TABLEAU XXX : Incorporation de l'ADN dans les souches rec$^+$, recA1, recB3 et rec-4

Souche réceptrice	Expérience N°	Temps de contact avec l'ADN (minutes)	ADN incorporé			Transformation	
			CPM/ml	ng/ml	Incorporation relative (1)	Fréquence	Transformation relative (1)
1026 rec$^+$	1	30	2616	5,3	100	1,11 10^7	100
	2	10	1088	2,6	100	1,13 10^7	100
	2	30	4156	9,7		1,05 10^7	
1025 recA1	1	10	468	0,7	35	2,30 10^6	13
	1	30	1512	2,3	43	5,76 10^5	5
	2	10	470	1,0		-	
	2	30	1658	5,3		-	
	3	30	1122	2,8		1,97 10^5	
	4	10	448	1,0		6,45 10^5	
	4	30	1072	2,4		7,30 10^5	
955 recB3	1	30	1214	3,3	84	7,30 10^6	57
	2	30	3242	9,3		4,97 10^6	
956 rec-4	1	10	196	0,4	17	0	0
	1	30	522	1,2	17	0	0
	2	10	216	0,5		0	
	2	30	612	1,5		0	
168 I$^+$ NT	1	10	24	0,0	0	0	0
	1	30	34	0,0	0	0	0

- La souche donatrice est 168 T$^-$ (trpC2 thyX thyY)
  La concentration en ADN est 1 µg/ml
- (1) Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes au temps correspondant
- (2) La fréquence de la transformation correspond au nombre de cellules transformées par µg d'ADN exogène.

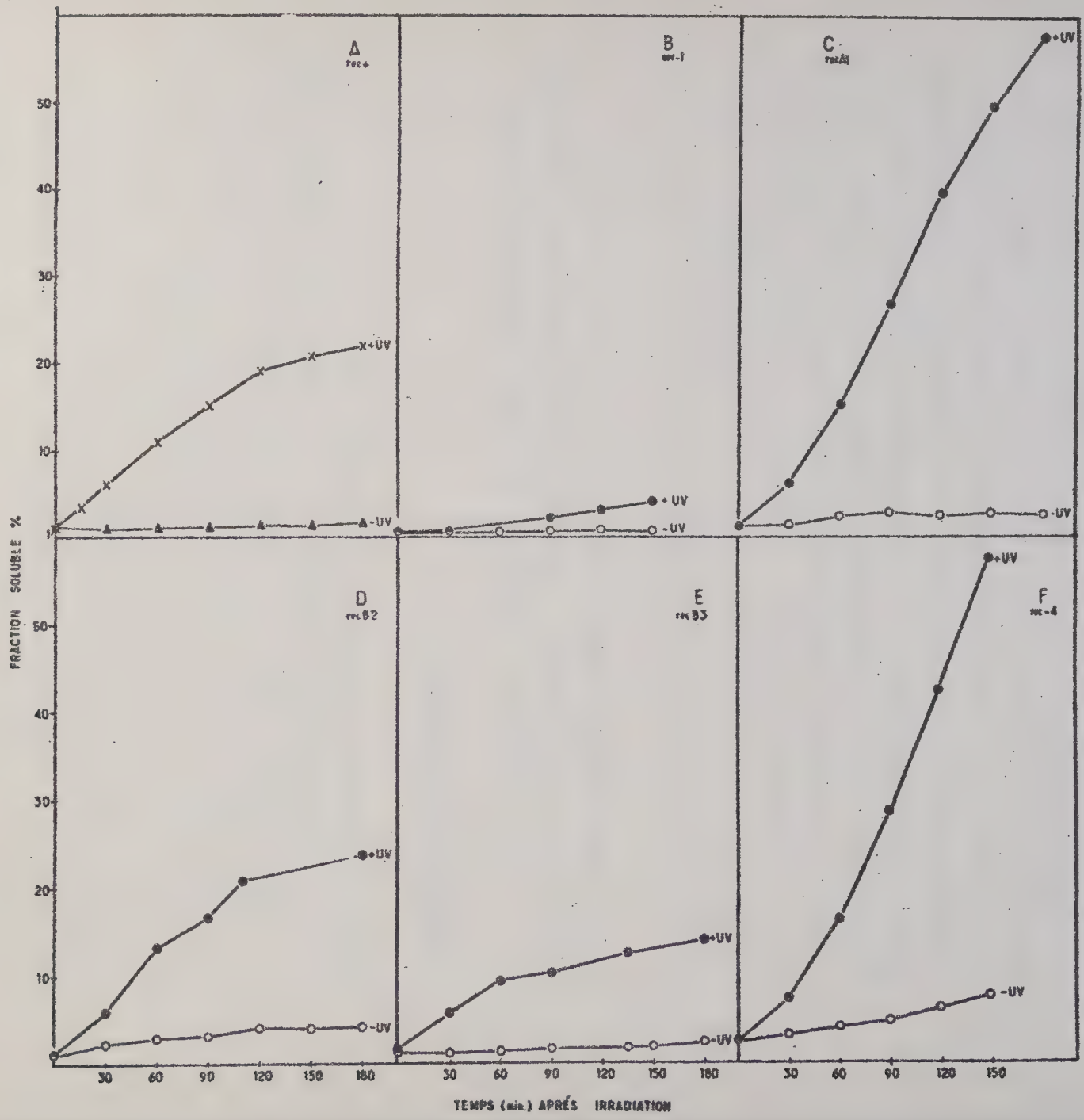
Tableau XXX : (suite)

- Les marqueurs sélectifs sont pour les souches 1025 et 1026 *metB3*$^+$
  955 et 956 *ilvC1*$^+$
  168 I$^+$ NT *his-2*$^+$

- La souche 168 I$^+$ NT est *rec*$^+$ et non transformable.
- Les détails des expériences sont donnés dans le Chapitre I.

Figure 9 : Dégradation de l'ADN après irradiation chez les souches *rec*$^+$, *rec* et *uvr*.

Une culture en phase exponentielle dont la croissance a été effectuée en présence de thymidine tritiée pendant au moins trois générations est irradiée par les U.V. Les cellules sont alors incubées à 37° et à différents temps des échantillons sont prélevés et mélangés à de l'acide trichloracétique à 0° (concentration finale 5 %). La radioactivité de la fraction acidosoluble à 0° est déterminée comme il est indiqué dans le Chapitre I. Elle est exprimée en pourcentage de la radioactivité totale avant irradiation.


A
rec+
B
rec-1
C
recA1
D
rec82
E
rec83
F
rec-4
+UV
-UV
FRACTION SOLUBLE %
TEMPS (min.) APRÉS IRRADIATION

avons étudié l'aptitude à synthétiser l'ADN après UV. chez les différents mutants. Pour cela nous avons mesuré l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules après irradiation (Fig. 10). Chez les souches recB2 et recB3 la synthèse de l'ADN reprend après un temps de latence de l'ordre de 30 mn comme chez la souche parentale. Par contre elle est considérablement diminuée chez les souches recA1, rec-4 et uvr-1. Chez la souche rec-4, en particulier, la synthèse d'ADN après une heure et 30 minutes d'incubation ne représente que 2,5 % de celle observée chez la souche parentale (pour une même dose UV.). Après une dose de 900 ergs/mm^2 elle est encore nettement décelable chez les souches rec+, recB2 et recB3, elle est totalement absente chez les autres mutants.

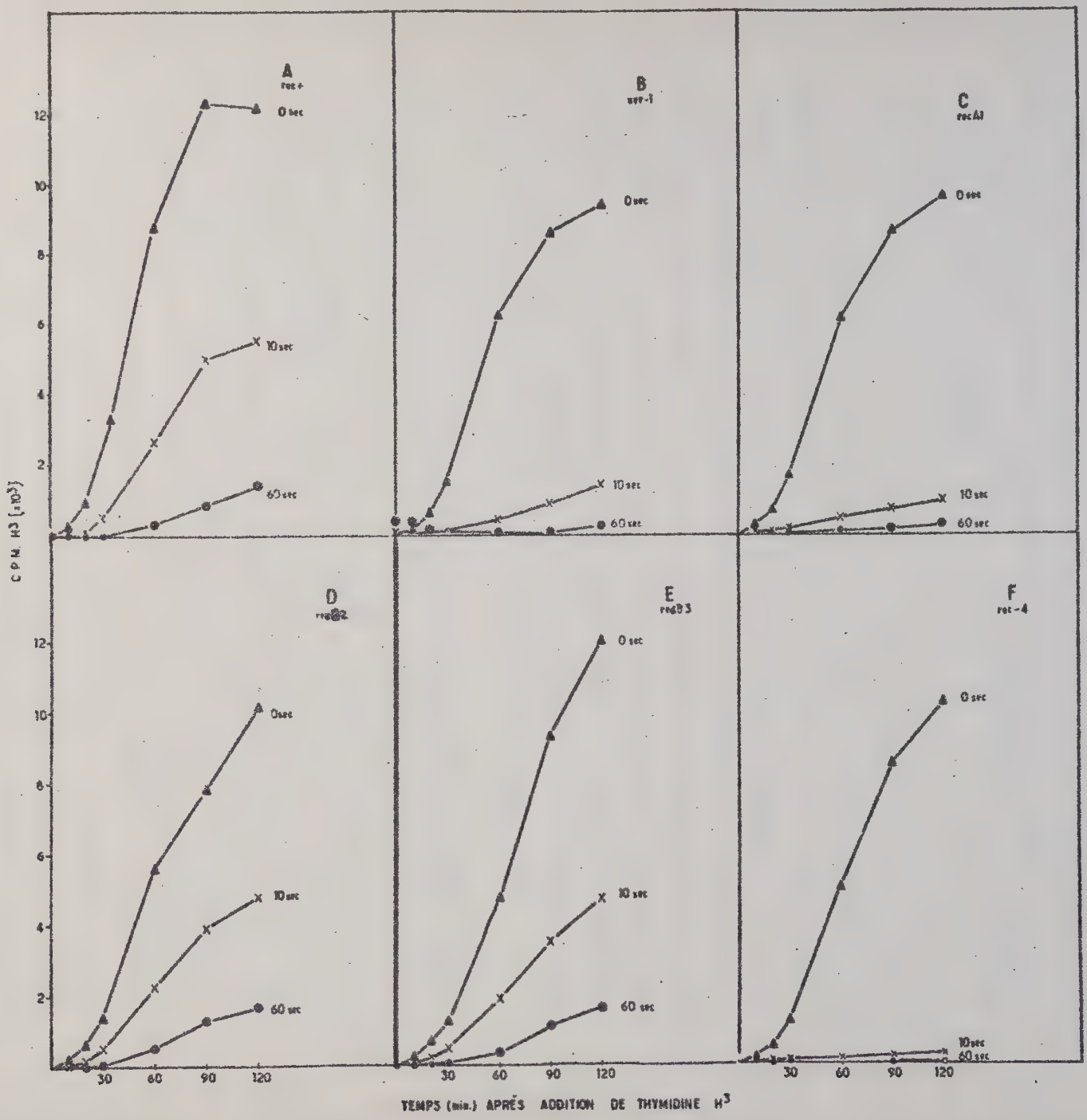
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Parmi les mutants, sensibles aux rayons ultraviolets, que nous avons étudiés seul uvr-1 n'a aucun effet sur la recombinaison, les autres mutants recA1, recB2, recB3, rec-4 l'affectent à divers degrés.

La mutation uvr-1 entraine, outre la sensibilité aux U.V. et à la mitomycine C, l'absence de réparation des lésions produites par les rayons U.V. dans le génome des bactériophages. La dégradation de l'ADN et l'incorporation de thymidine tritiée après irradiation sont quasiment nulles. La fréquence de transformation et de transduction par les phages SP10, PBS1 et 3NT n'est pas diminuée par la présence d'une telle mutation. Chez d'autres organismes et en particulier chez E.Coli des mutants présentent des propriétés identiques à celles des souches uvr-1. Les auteurs (31) ont montré qu'après irradiation par les rayons U.V. les dimères de pyrimidine persistaient dans l'ADN au lieu d'être excisés. L'absence de cette étape empêcherait la restauration de la structure initiale. Il semble très probable que le mutant uvr-1 de même que hcr-9 étudié par OKUBO et NAKAYAMA (53) soient incapables d'exciser les dimères de pyrimidine.

Figure 10 : Incorporation de thymidine tritiée après irradiation par les souches rec$^+$, rec et uvr.

Une culture en phase exponentielle est irradiée par les U.V. Elle est ensuite incubée à 37° en présence de thymidine tritiée ; à différents temps des échantillons sont prélevés et mélangés à de l'acide trichloracétique à 0°. La radioactivité de la fraction insoluble est déterminée (voir Chapitre I).


A
rec+
B
uvr-1
C
recA1
D
recB2
E
recB3
F
rec-4
0 sec
10 sec
60 sec
CPM H3 (x10³)
TEMPS (min.) APRÈS ADDITION DE THYMIDINE H³

La fréquence de transformation des souches recA1, recB2, recB3 et rec-4 est inférieure à celle des souches rec+. Cette faible aptitude à la transformation ne peut pas être imputée à une déficience dans le développement de la compétence. En effet, la transduction par le bactériophage SP10 est affectée au même degré que la transformation. D'autre part, la fréquence de transformation calculée par rapport à la quantité d'ADN qui a pénétré dans les cellules compétentes, reste inférieure à celle de la souche parentale. OKUBO et NAKAYAMA (53) ont également montré que la diminution de la fréquence de transformation du mutant MC1 souche originale portant recB2 n'était pas dûe à une absorption moindre de l'ADN par les cellules compétentes. On peut en conclure que les mutations recA1, recB2, recB3 et rec-4 affectent réellement la recombinaison.

Les propriétés que confèrent les mutations recB2 et recB3 présentent certaines similitudes. En outre ces mutations sont situées sur un même segment d'ADN. La fréquence de la transformation et de la transduction par SP10 est abaissée d'un facteur 2 à 5 ; la transduction par PBS1 est également affectée. La dégradation de l'ADN et l'incorporation de thymidine tritiée après irradiation par les U.V. sont tout à fait comparables à celles de la souche parentale. OKUBO et NAKAYAMA (53) ont fait les mêmes observations chez la souche MC1. La mutation recA1 affecte plus sévèrement que les précédentes la fréquence de recombinaison par transformation ou transduction par SP10 (fréquence résiduelle 2 à 5 %). De plus, la valeur du taux de recombinaison entre marqueurs liés est diminuée. Par contre, elle n'a aucun effet sur la transduction par PBS1. Chez les mutants rec d'E.coli (27) et P.aeruginosa (30) la fréquence de la transduction est affectée au même degré que la fréquence de la conjugaison. Dans les souches rec-4 aucun phénomène de recombinaison n'est décelable quelque soit la méthode d'analyse employée. Chez ces deux mutants, recA1 et rec-4, la dégradation de l'ADN après irradiation est accrue, elle est au moins deux fois plus importante que celle observée chez les souches parentales. L'incorporation de thymidine tritiée est fortement diminuée, elle est

pratiquement nulle (moins de 1 pour cent chez les souches rec-4 par rapport à la parentale).

On peut émettre l'hypothèse que l'activité enzymatique déficiente chez les souches recB2 et recB3 serait celle qui permet la jonction des extrêmités libres, après irradiation lorsque la synthèse de réparation a eu lieu et au cours de l'intégration d'un segment d'ADN exogène dans le génome de la souche réceptrice en transformation et en transduction. On peut penser aussi que les mutations recB2 et recB3 correspondent à la production d'un inhibiteur de la recombinaison.

Les mutations recA1 et rec-4 pourraient affecter une activité exonucléasique laquelle serait accrue soit du fait de l'activation de l'enzyme, soit du fait d'une modification de son système de régulation. Cette activité excessive serait responsable de l'augmentation de la dégradation de l'ADN après U.V. L'absence d'incorporation de thymidine tritiée pourrait être due à l'hydrolyse de l'ADN nouvellement synthétisé ou à la réutilisation préférentielle des produits de dégradation. Au cours de la transformation et de la transduction par SP10 l'ADN exogène serait partiellement hydrolysé (ce pourrait être la raison pour laquelle la quantité d'ADN exogène présent dans les cellules en transformation est inférieure chez les souches recA1 et rec-4). D'autre part, la coupure dans l'ADN récepteur nécessaire à l'intégration de l'exogénote créerait des extrémités libres permettant ainsi à l'enzyme d'agir. D'après ce schéma les mutations recA1 et rec-4 correspondraient à la même déficience. Cependant recA1 n'a aucun effet sur la transduction par PBS1 alors que rec-4 l'abolit comme la transformation ou la transduction par SP10. On pourrait expliquer cette différence en faisant l'hypothèse suivante : l'activité exonucléasique modifiée par recA1 est semblable à celle de l'exonucléase I d'E. coli, c'est à dire active sur l'ADN monocaténaire seulement alors que celle affectée par rec-4 est du type de l'exonucléase II, c'est à dire active sur l'ADN bicaténaire et aussi sur l'ADN monocaténaire. Il faut alors admettre que la transduction par PBS1 nécessite une activité

exonucléasique différente de celle utilisée au cours de la transformation. L'intégration d'un fragment d'ADN exogène au cours de la transduction par PBS1 ne se ferait pas selon le modèle établi dans le cas de la transformation, c'est à dire sous forme monocaténaire. On peut émettre une seconde hypothèse pour expliquer le comportement des mutants recA1 et rec-4. On peut remarquer qu'il existe une certaine similitude entre les propriétés de ces mutants et celles de mutants rec-A d'E.Coli appelés "reckless" bien qu'il n'y ait chez B.subtilis aucune dégradation spontanée de l'ADN. Selon HOWARD-FLANDERS, THERIOT et STEDEFORD (33) la réparation des dommages provoqués dans l'ADN par les rayons ultraviolets s'effectuerait soit par excision des dimères de pyrimidine, soit par recombinaison. Au cours de la "replication" du chromosome qui fait suite à une irradiation par les U.V. la chaine nouvellement synthétisée comporterait des discontinuités au niveau des dimères persistant dans la chaine copiée. Chez les souches rec^+ cette discontinuité serait réparée par recombinaison. Du fait de la mutation rec-A la réunion des extrémités libres ne pourrait pas se faire ce qui permettrait la dégradation de l'ADN ; la recombinaison serait donc abortive. Pour la même raison l'obtention d'une cellule transformée ou transduite serait impossible ; il n'y aurait pas formation des liaisons phosphodiester entre le fragment d'ADN exogène et l'ADN de la cellule réceptrice. Nous avions précédemment proposé une hypothèse du même type dans le cas des mutations recB2 et recB3. Si une telle déficience doit entraîner une augmentation de la dégradation de l'ADN, cette hypothèse ne peut pas rendre compte des propriétés des mutants recB2 et recB3. On peut aussi supposer qu'il existe plusieurs enzymes qui catalysent la formation de la liaison phosphodister ; l'une agirait uniquement au niveau de la recombinaison (ce serait la fonction $recA1^+$ ou $rec\text{-}4^+$), l'autre agirait au cours de la réparation par excision des dimères de pyrimidine et aussi de la recombinaison (fonction $recB^+$).

Nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses pour tenter de définir l'activité enzymatique affectée par les différentes mutations rec que nous avons étudiées. Quoi qu'il en soit, un fait est important, c'est l'existence

de mutations qui affectent à des degrès très différents la transformation ou la transduction par SP10 d'une part, la transduction par PBS1 d'autre part.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

L'ensemble de nos résultats constitue une contribution à l'analyse génétique chez Bacillus subtilis par deux méthodes, la transformation et la transduction. La comparaison des résultats obtenus dans l'un et l'autre cas a mis en évidence des différences qui semblent être en rapport avec le mécanisme de recombinaison au niveau moléculaire.

Nos premiers résultats obtenus par transformation ont montré que les gènes qui gouvernent la biosynthèse de l'isoleucine et de la valine ne sont pas tous situés dans une même région du chromosome bactérien comme c'est le cas chez E.coli et S.thyphimurium. Chez B.subtilis les gènes qui régissent la synthèse de la thréonine désaminase et de la déshydrase sont transférés par un même segment d'ADN transformant alors que ceux qui gouvernent la synthèse de l'enzyme de condensation et de la réductoisomérase sont portés par un autre segment et sont liés à un ou plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de la leucine. Cette situation pose des problèmes intéressants concernant la régulation de ces voies de biosynthèse chez B.subtilis (ils sont actuellement étudiés dans notre laboratoire).

L'analyse de ces deux segments d'ADN nous a permis de mettre en évidence des cas de liaison très faibles, ce qui n'avait pas été observé auparavant chez cet organisme. Nous avons montré qu'il s'agissait d'une véritable liaison physique. L'hypothèse selon laquelle subsistaient, dans nos préparations d'ADN, des fragments plus longs que la plupart des segments transformants s'est également trouvée confirmée par des résultats analogues de KELLY et PRITCHARD (39). Ce sont finalement les résultats

obtenus par transduction à l'aide du bactériophage PBS1 qui ont établi sans ambiguïté les relations de liaison suggérées. L'existence, en transformation, d'une gamme dans la valeur des fréquences de recombinaison entre marqueurs, supérieure à 50 % et allant jusqu'à 99 % semble indiquer que la fragmentation du chromosome bactérien, au cours de l'extraction de l'ADN, ne se produit pas à des endroits fixes. Ceci n'exclue pas qu'il puisse exister des points de cassure préférentiels à certains endroits du génome.

La transduction par PBS1 nous a permis non seulement de confirmer l'existence de faibles liaisons suggérées par transformation mais aussi de mettre en évidence de nouvelles relations de liaison. Ce bactériophage qui est d'une taille particulièrement grande transfère de longs fragments d'ADN. Nos résultats génétiques suggèrent que leur longueur est au moins trois à quatre fois supérieure à celle des segments d'ADN obtenus par extraction à partir des bactéries. Par des croisements à deux et trois facteurs, effectués entre de nombreux mutants, nous avons pu dresser la carte génétique de deux régions relativement étendues du génome de B.subtilis. D'après la carte proposée par DUBNAU et ses collaborateurs (16), on pourrait évaluer ces régions à environ 16 % du génome. La fréquence de recombinaison entre deux marqueurs, lorsqu'ils sont assez voisins, dépend non seulement de la distance mais aussi de la méthode d'analyse utilisée, transformation ou transduction. On pourrait se demander s'il s'agit d'une différence fondamentale entre le phénomène de la transformation et celui de la transduction. Ceci ne semble pas vrai à première vue puisque ces différences ne concernent que le système de transduction des phages PBS1 et 3NT et ne s'observent pas avec un autre système, celui du phage SP10. En effet EPHRATI-ELIZUR et FOX (19) ont comparé les fréquences de recombinaison entre deux couples de marqueurs (trpC2 his-2 et trpC2 tyr-1), situés sur le segment qui porte les gènes de biosynthèse du tryptophane, par transformation et transduction à l'aide du phage SP10. Ils ont obtenus les mêmes valeurs avec les deux méthodes.

Pour expliquer les différences que nous avons observées entre la transformation et la transduction par PBS1 nous avons émis les hypothèses suivantes :

1. L'ADN bactérien transféré par PBS1 a subi des modifications de nature à modifier la fréquence de la recombinaison.

2. La différence de taille entre les segments d'ADN transférés est responsable de la différence observée au niveau des fréquences de recombinaison.

3. Le mécanisme de la recombinaison qui opère au cours de la transduction par PBS1 est différent de celui utilisé par la cellule au cours de la transformation ou de la transduction par SP10.

La première hypothèse a pu être aisément éliminée. En effet, la fréquence de transformation simultanée de deux marqueurs est la même que l'ADN soit extrait à partir des cellules d'une culture de B.subtilis ou à partir des particules transductrices de PBS1 (voir Tableau XIX, Chapitre III).

Les résultats que nous avons obtenus pourraient aussi bien s'interpréter par la seconde que par la troisième hypothèse.

Si on considère des marqueurs très voisins dont la distance est faible par rapport à la longueur totale du segment transformant et si l'appariement entre l'ADN exogène et le chromosome bactérien est continu il n'y a pas de raison pour que la fréquence de recombinaison entre marqueurs liés dépende de la taille du fragment d'ADN exogène. On pourrait dans ce cas invoquer un appariement discontinu. Si la distance entre deux zones d'appariement est plus grande lorsque le segment d'ADN exogène est plus long on doit s'attendre à ce que la fréquence de recombinaison entre marqueurs liés soit plus faible dans le cas de la transduction par PBS1. L'analyse des croisements à trois facteurs faisant intervenir des marqueurs liés est en faveur d'une telle hypothèse.

VERHOEF (68) a effectué une étude comparative de deux méthodes d'analyse chez E. Coli. Il a comparé les résultats de croisements effectués par conjugaison et transduction par le phage P1. En examinant la recombinaison sur un court segment délimité il observe que la fréquence de recombinaison est identique dans l'un et l'autre cas. Les particules transductrices de P1 ont une taille de 6.10^7 daltons qui est évidemment très différente de celle des fragments d'ADN exogènes introduits dans la cellule par conjugaison. Les résultats de cet auteur ne sont pas favorables à la seconde hypothèse que nous avons énoncée.

La troisième hypothèse que nous avons proposée est que la recombinaison s'effectue par un mécanisme différent ou tout au moins que certaines étapes sont différentes. On devait donc trouver des mutations qui affectent la transformation et non la transduction par PBS1. Nous avons étudié des mutants qui présentent une sensibilité accrue aux rayons ultraviolets et qui entrainent une diminution de la fréquence de recombinaison. La mutation rec-4 rend impossible la formation de clones transformés ou transduits (soit par SP10 soit par PBS1). Les mutations recB2 et recB3 affectent également la transformation, la transduction par SP10 et par PBS1. Le fait intéressant est que la mutation recA1 diminue de la même façon la fréquence de la transformation et celle de la transduction par SP10 mais n'a aucun effet sur la transduction par PBS1.

Nous n'avons pas pu déterminer l'activité enzymatique déficiente chez ces différents mutants, nous ne pouvons que proposer certaines hypothèses concernant les fonctions gouvernées par les loci en question. Il semble évident qu'au moins certaines fonctions ne sont pas communes à la transformation (ou transduction par SP10) et à la transduction par PBS1. Celle du gène $recA^+$ est nécessaire à la transformation (et transduction par SP10) mais non à la transduction par PBS1. On peut penser que le mécanisme de la recombinaison utilisé au cours de la transduction par PBS1 est différent parce que la taille du fragment introduit dans la bactérie est plus grande. La taille des fragments d'ADN transférés par SP10 n'a pas été mesurée mais d'après certaines récentes estimations elle est certainement inférieure à celle des fragments que transfère PBS1.

Alors que nous rédigions cet exposé DUBNAU, DAVIDOFF-ABELSON et SMITH (17) ont publié une étude comparative de la transformation et de la transduction des souches 168 et 23 de B.subtilis. Nous avons utilisé quelquefois la souche 23 au cours de ce travail. Nous rappellerons ici brièvement les différences entre ces deux souches. 168M est bien transformable tandis que 23 ne l'est que très peu. L'ADN de la souche 23 peut être utilisé comme donateur pour la transformation de 168M et les valeurs de recombinaison obtenues sont identiques. Le phage SP10 transduit les deux souches mais ne se multiplie que sur 23. Le phage PBS1 peut se multiplier sur les deux souches et les transduire l'une comme l'autre. D'après les résultats de transformation et de transduction par SP10 il semblait que l'homologie entre l'ADN des deux souches était parfaite. Selon DUBNAU et ses collaborateurs (17) il semble que l'homologie n'est pas totale si on considère des régions plus étendues. Dans le cas de transduction hétérologue (c'est à dire PBS1 propagé dans 23, souche réceptrice 168 et réciproquement) les fréquences de transduction relatives pour certains marqueurs sont très faibles et les fréquences de recombinaison entre marqueurs fortement liés sont voisines de celles observées en transformation. D'autre part, la mutation recA1 a un effet sur la transduction hétérologue. D'après ces résultats les auteurs concluent qu'il doit exister deux mécanismes de recombinaison, l'un prédominant en transformation et pouvant agir même si l'homologie entre les génomes en présence n'est pas totale (en particulier, lorsque la transduction est hétérologue), l'autre prédominant en transduction mais n'agissant que si l'homologie est bonne. Ils considèrent que c'est la taille des fragments d'ADN qui détermine la voie de la recombinaison utilisée.

Les résultats présentés dans notre travail n'ont pas suggéré une absence d'homologie entre les génomes 23 et 168. Nous avons effectué quelques expériences de transduction hétérologue. Dans ce cas, le bactériophage PBS1 a été propagé sur 23 et la souche réceptrice était 168. Pour les trois couples de marqueurs que nous avons examinés (trpC2 - metB3, trpC2 - lys-1, ilvC1 - phe-1) les fréquences de recombinaison étaient identiques à celles

que l'on obtient en transduction homologue. Toutefois nos expériences diffèrent de celles de DUBNAU et ses collaborateurs (17) parce que les couples de marqueurs que nous avons examinés ne sont pas liés en transformation tandis que ces auteurs ont effectué leurs expériences avec des marqueurs fortements liés.

Quoi qu'il en soit, il semble exister deux mécanismes pour la recombinaison génétique chez B.subtilis. Il se pourrait que le facteur déterminant soit la taille du segment d'ADN exogène mais il se pourrait aussi que la transduction par SP10 emprunte le même mécanisme que la transduction par PBS1. Des études plus approfondies pour préciser les fonctions controlées par les loci recA, recB, sont nécessaires pour résoudre ce problème.

RESUME

L'analyse génétique par transformation chez B.subtilis, de mutants des chaines de biosynthèse de l'isoleucine et de la valine a permis de mettre en évidence deux nouveaux groupes de liaison chez cet organisme. Les gènes de la thréonine désaminase (étape 1 de la synthèse de l'isoleucine) et de la déshydrase (étape 4) sont portés par un même segment d'ADN transformant, le gène de la réductoisomérase (étape 3) est situé sur un autre segment lié à un ou plusieurs gènes qui gouvernent la synthèse de la leucine.

La méthode de la transformation par de l'ADN traité, in vitro, à l'acide nitreux nous a permis d'introduire de nouveaux marqueurs qui présentaient des relations de liaison avec ceux déjà étudiés. Des cartes partielles des deux nouveaux segments d'ADN transformant ont été dressées.

L'existence de cas de liaison très faible (1 à 5 % de cotransfert) entre certains marqueurs, dus à la présence, dans nos préparations, de fragments d'ADN d'une longueur nettement supérieure à celle de la plupart des autres segments, a été confirmée par transduction à l'aide du bactériophage tempéré PBS1. Une étude détaillée de la transduction par ce bactériophage a permis de mettre en évidence de nouvelles relations de liaison et de construire des cartes génétiques de deux régions relativement étendues du génome de B.subtilis. Les résultats génétiques montrent que les fragments d'ADN transférés par ce phage ont une longeur au moins trois fois supérieure à celle des segments d'ADN transformant.

Tous les marqueurs liés par transformation le sont également en transduction, cependant la valeur du taux de recombinaison est beaucoup plus faible lorsqu'elle est déterminée par transduction. Il ne semblait pas s'agir d'une

différence fondamentale entre transformation et transduction puisque les résultats obtenus en transduction par le phage SP10 sont analogues à ceux obtenus par transformation. Pour tenter d'expliquer ces différences nous avons envisagé plusieurs hypothèses : 1) L'ADN bactérien a subi des modifications au cours de son transfert par le phage PBS1. 2) La différence de longueur des segments transférés est responsable des différences observées au niveau des fréquences de recombinaison. 3) Le mécanisme de recombinaison qui opère au cours de la transduction par PBS1 n'est pas le même que celui utilisé par la cellule au cours de la transformation (ou de la transduction par le phage SP10). La première hypothèse a pu être éliminée très facilement en comparant les résultats obtenus par transformation, l'ADN utilisé étant extrait soit à partir des particules transductrices PBS1, soit à partir des cellules bactériennes. Les résultats génétiques qui sont en faveur de la seconde hypothèse ne sont pas contraires à la troisième, aussi pour mettre en évidence d'éventuelles différences au niveau du mécanisme de la recombinaison nous avons étudié des mutants sensibles aux radiations ultraviolettes et affectés dans le processus de recombinaison.

Les mutations recB2, recB3 et rec-4 entrainent une diminution de la fréquence de transformation et de transduction par les deux bactériophages SP10 et PBS1. Par contre la mutation recA1 qui affecte très sévèrement la fréquence de transformation et de transduction par SP10 n'a aucun effet sur la transduction par PBS1. Pour tenter de préciser les fonctions des différents gènes rec nous avons étudié certaines propriétés de ces mutants comme par exemple la dégradation et la synthèse d'ADN après irradiation. Pour interpréter les résultats obtenus au cours de ces expériences nous avons envisagé deux hypothèses. Toutefois, quelque soient les fonctions affectées par les différentes mutations étudiées, il semble bien probable que les processus de recombinaison en transformation et en transduction par le phage PBS1 diffèrent par au moins une étape.

B I B L I O G R A P H I E

1 ANAGNOSTOPOULOS C., BARAT M., SCHNEIDER A.M.
Compt. Rend., 1964, 258, 749

2 ANAGNOSTOPOULOS C., CRAWFORD I.P.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1961, 47, 378

3 ANAGNOSTOPOULOS C., SPIZIEN J.
J. Bacteriol., 1961, 81, 741

4 ARMSTRONG F.B., WAGNER R.P.
Genetics, 1964, 50, 957

5 BARAT M., ANAGNOSTOPOULOS C., SCHNEIDER A.M.
J. Bacteriol., 1965, 90, 357

6 BILLEN D., HEWITT R.R.
J. Bacteriol., 1967, 94, 1538

7 BODMER W.F., GANESAN A.T.
Genetics, 1964, 50, 717

8 BÖHME H.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 28, 191

9 BOTT F.K., WILSON G.A.
J. Bacteriol., 1967, 94, 562

10 BOYCE R.P., HOWARD-FLANDERS P.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1964, 51, 293

11 BURTON K.
Biochem. J., 1956, 62, 315

12 CLARK A.J., CHAMBERLIN M., BOYCE R.P., HOWARD-FLANDERS P.
J. Mol. Biol., 1966, 19, 142

13 CLARK A.J., MARGULIES A.D.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1965, 53, 451

14 CSIZAR K., IVANOVICS G.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1965, XII, 73

15 DEMEREC M., ADELBERG E.A., CLARK J., HARTMAN P.E.
Genetics, 1966, 54, 61

16 DUBNAU D., GOLDTHWAITE C., SMITH I., MARMUR J.
J. Mol. Biol., 1967, 27, 163

17 DUBNAU D., DAVIDOFF-ABELSON R., SMITH I.
J. Mol. Biol., 1969, 45, 155

18 EISERLING F.A.
J. Ultrastr. Res., 1967, 17, 342

19 EPHRATI-ELIZUR E., FOX M.S.
Nature, 1961, 192, 433

20 EPHRATI-ELIZUR E., SRINIVASAN P.R., ZOMENHOF S.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1961, 47, 378

21 EPHRUSSI TAYLOR H., GRAY T.C.
J. Gen. Physiol., 1966, 49, 211

22 EPHRUSSI TAYLOR H., SICARD A.M., KAMEN R.
Genetics, 1965, 51, 455

23 FREUNDLICH M., BURNS R.O., UMBARGER N.E.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1962, 48, 1804

24 FOX M.S., ALLEN M.K.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1964, 52, 412

25 GLANVILLE E.V., DEMEREC M.
Genetics, 1960, 45, 1359

26 HARM W.
Z. Vererbungslehre, 1963, 94, 67

27 HERTMAN I., LURIA S.E.
J. Mol. Biol., 1967, 23, 117

28 HILL R.
Mut. Res., 1968, 6, 472

29 HOCH J.A., BARAT M., ANAGNOSTOPOULOS C.
J. Bacteriol., 1967, 93, 1925

30 HOLLOWAY B.W.
Mut. Res., 1966, 3, 452

31 HOWARD FLANDERS P., BOYCE R.P., THERIOT L.
Genetics, 1966, 53, 1119

32 HOWARD FLANDERS P., THERIOT L.
Genetics, 1966, 53, 1137

33 HOWARD FLANDERS P., THERIOT L., STEFORD J.B.
J. Bacteriol., 1969, 97, 1134

34 HUNTER B., YAMAGISHI H., TAKAHASHI I.
J. Virol., 1967, 1, 841

35 IKEDA H., TOMIZAWA J.
J. Mol. Biol., 1965, 14, 85

36 IKEDA H., TOMIZAWA J.
J. Mol. Biol., 1965, 14, 120

37 JOYS T.M.
J. Bacteriol., 1965, 90, 1575

38 JYSSUM K.
J. Bacteriol., 1968, 95, 165

39 KELLY M.S., PRITCHARD R.H.
J. Bacteriol., 1965, 89, 1313

40 LACKS S.
J. Mol. Biol., 1962, 5, 119

41 LACKS S.
J. Mol. Biol., 1967, 29, 327

42 LACKS S.
Genetics, 1966, 53, 207

43 LACKS S., HOTCHKISS R.D.
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 39, 508

44 LEIBOVICI J.
Résultats non publiés.

45 MAHLER I., NEUMAN J., MARMUR J.
Biochem. Biophys. Acta, 1963, 72, 69

46 MARMUR J.
J. Mol. Biol., 1961, 3, 208

47 MESELSON M.
J. Mol. Biol., 1964, 9, 734

48 MICHEL J.F., SICARD A.M., EPHRUSSI-TAYLOR H.
Exp. Cell. Res., 1964, 36, 368

49 MOHN G.
mol. Gen. Genetics, 1968, 101, 43

50 NESTER E.W., LEDERBERG J.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1961, 47, 52

51 OISHI M., YOSHIKAWA H, SUEOKA N.
Nature, 1964, 204, 1069

52 OKUBO S., STRAUSS B., STODOLSKY M.
Virology, 1964, 24, 552

53 OKUBO S., NAKAYAMA H.
Mut. Res., 1967, 4, 533

54 O'SULLIVAN A., SUEOKA N.
J. Mol. Biol., 1967, 27, 349

55 PETTIJOHN D., HANAWALT P.
J. Mol. Biol., 1964, 9, 395

56 PITTARD J., LOUTIT J.S., ADELBERG E.A.
J. Bacteriol., 1963, 85, 1394

57 SETLOW R.B., CARRIER W.L.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1964, 51, 226

58 SETLOW R.B., SETLOW J.K.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1962, 48, 1250

59 SETLOW R.B., SWENSON P.A., CARRIER W.L.
Science, 1963, 142, 1464

60 SPIZIZEN J.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1958, 44, 1072

61 TAKAHASHI I.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, 5, 171

62 TAKAHASHI I.
J. Gen. Microbiol., 1963, 31, 211

63 TAKAHASHI I.
J. Bacteriol., 1966, 91, 101

64 TAKAHASHI I., MARMUR J.
Nature, 1963, 197, 794

65 TAKAHASHI I., MARMUR J.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 289

66 THORNE C.B.
Fed. Proc., 1961, 20, 254

67 THORNE C.B.
J. Bacteriol., 1962, 83, 106

68 VERHOEF C.
Symposium on the molecular mechanism of genetic recombination in microorganisms, Lunteren 1969

69 WILSON G.A., BOTT X.F.
J. Bacteriol., 1968, 95, 1439

70 YAMAGISHI H., TAKAHASHI I.
Virology, 1968, 36, 639

71 YOUNG F.E., SPIZIZEN J.
J. Bacteriol., 1961, 81, 823

72 YOSHIKAWA H., SUEOKA N.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1963, 49, 559

73 RAMAKRISHNAN T., ADELBERG E.A.
J. Bacteriol., 1965, 89, 661